

**Katarina Janječić**

# **Peptidni kozmeceutici**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Kozmetologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Pepiću na stručnom vodstvu te nesebičnom angažmanu kojim je uvelike pridonio nastanku ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i strpljenju ukazanima tijekom studija.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. BARIJERE PRI DERMALNOJ APSORPCIJI BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI.....	1
1.1.1. BARIJERA POVRŠINE KOŽE.....	1
1.1.2. ROŽNATI SLOJ KOŽE – GLAVNA BARIJERA DERMALNOJ APSORPCIJI BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI .....	3
1.1.3. BARIJERA ŽIVIH SLOJEVA EPIDERMISA.....	6
1.1.4. DERMIS.....	7
1.1.5. FOLIKULI DLAKE.....	7
1.2. KOZMECEUTICI – BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U KOZMETIČKIM PRIPRAVCIMA.....	8
1.2.1. ANTIOKSIDANSI.....	8
1.2.1.1. VITAMIN A .....	8
1.2.1.2. VITAMIN B3.....	9
1.2.1.3. VITAMIN C.....	10
1.2.1.4. VITAMIN E.....	11
1.2.1.5. PANTENOL (PROVITAMIN B5) .....	11
1.2.1.6. ALFA-LIPOIČNA KISELINA.....	12
1.2.1.7. UBIKINON ILI KOENZIM Q10 .....	12
1.2.1.8. KINETIN .....	12
1.2.2. BILJNE TVARI I PRIPRAVCI .....	13
1.2.2.1. EKSTRAKT ZELENOG ČAJA .....	13
1.2.2.2. SOJINI IZOFLAVONI .....	13
1.2.3. HIPOPIGMENTIRAJUĆE TVARI .....	13
1.2.3.1. HIDROKINON .....	13
1.2.3.2. ALOESIN .....	14
1.2.3.3. KOJIČNA KISELINA .....	14
1.2.4. DRUGI ZNAČAJNI KOZMECEUTICI.....	14

1.2.4.1.	HIDROKSILNE KISELINE.....	14
1.2.4.2.	PEPTIDI.....	15
1.2.4.3.	ŠEĆERNI AMINI.....	16
1.2.4.4.	CERAMIDI.....	17
1.2.4.5.	METALI .....	17
1.2.3.6.	ČIMBENICI RASTA.....	18
1.3.	KOZMECEUTICI – SADAŠNJI TREND I ANALIZA TRŽIŠTA .....	18
1.3.1.	OSNOVNE PODLOGE ZA OBLIKOVANJE KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA .....	20
1.3.2.	PROCJENA SIGURNOSTI KOZMETIČKIH PROIZVODA .....	21
1.3.3.	UČINKOVITOST I SIGURNOST PRIMJENE KOZMECEUTIKA .....	24
1.3.3.1.	TVARI ZA IZBJELJIVANJE I/ILI DEPIGMENTACIJU KOŽE .....	24
1.3.3.2.	TVARI ZA OVLAŽIVANJE KOŽE.....	27
1.3.3.3.	TVARI PROTIV BORA.....	28
1.3.3.4.	ANTIOKSIDANSI .....	29
1.3.3.5.	TVARI ZA ZAŠTITU OD SUNČEVOG ULTRALJUBIČASTOG ZRAČENJA I PROTIV FOTOSTARENJA KOŽE .....	31
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	34
3.	MATERIJALI I METODE .....	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1.	BIOLOŠKA ULOGA KONSTITUTIVNIH PEPTIDA KOŽE .....	36
4.1.1.	ANTIMIKROBNI PEPTIDI .....	36
4.1.1.1.	KATELICIDINI.....	36
4.1.1.2.	DEFENZINI.....	37
4.1.1.3.	GRANULIZIN .....	39
4.1.1.4.	PSORIAZIN.....	39
4.1.1.5.	RNAZA 7.....	40
4.1.1.6.	ADRENOMEDULIN .....	40

4.1.1.7.	ANTILEUKOPROTEAZE .....	40
4.1.1.8.	DERMICIDIN 1L .....	40
4.1.2.	PEPTIDI ZNAČAJNI ZA CIJELJENJE RANE.....	41
4.1.2.1.	ČIMBENIK RASTA.....	41
4.1.2.2.	RGD PEPTIDI .....	41
4.1.2.3.	PEPTIDI BAKRA.....	42
4.1.2.4.	INTERLEUKINI.....	42
4.1.3.	HORMON RASTA I SRODNI PEPTIDI.....	42
4.1.4.	TRANSFORMIRAJUĆI ČIMBENIK RASTA-BETA .....	43
4.1.5.	PROTUUPALNI PEPTIDI .....	43
4.1.7.	ELAFIN.....	44
4.2.	ULOGA PEPTIDA U RAZLIČITIM BOLESTIMA KOŽE .....	44
4.2.1.	ATOPIJSKI DERMATITIS .....	44
4.2.2.	PSORIJAZA.....	45
4.2.3.	CIJELJENJE RANE.....	46
4.2.4.	VIRUSNE BOLESTI.....	47
4.2.5.	KARCINOM EPITELNIH STANICA KOŽE.....	47
4.3.	PEPTIDI KAO KOZMECEUTICI.....	47
4.3.1.	PEPTIDI KOJI MODULIRAJU SIGNALNE PUTEVE .....	47
4.3.2.	PEPTIDI KOJI MODULIRAJU NEUROTRANSMITORE .....	49
4.3.3.	PEPTIDI KOJI MODULIRAJU PRIJENOSNE NOSAČE.....	50
4.4.	KOZMETOLOŠKO-TEHNOLOŠKI PRISTUPI OBLIKOVANJA I POBOLJŠANJA DERMALNE BIORASPOLOŽIVOSTI PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA .....	52
4.4.1.	OBLIKOVANJE KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA S DODATKOM POJAČIVAČA DERMALNE APSORPCIJE.....	52
4.4.2.	UKLAPANJE PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA U NANOTEHNOLOŠKE NOSAČE.....	53

4.4.2.1.	VEZIKULARNI NANONOSAČI.....	54
4.4.2.2.	MIKRO- I NANOČESTICE.....	55
4.4.2.3.	POVEĆANJE LIPOFILNOSTI PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA PRIPRAVOM KONJUGATA S MASNIM KISELINAMA .....	56
5.	ZAKLJUČCI.....	58
6.	LITERATURA .....	59
7.	SAŽETAK .....	61
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD		



## 1. UVOD

### 1.1. BARIJERE PRI DERMALNOJ APSORPCIJI BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI

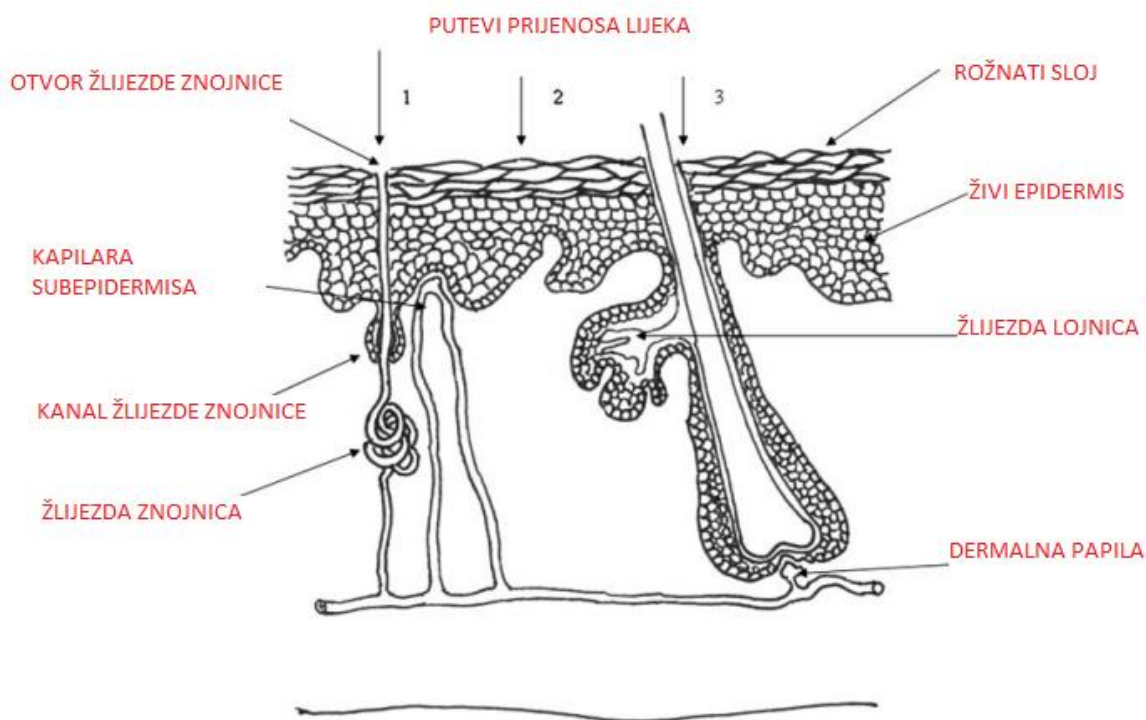
Trenutno je na tržištu dostupan mali broj lijekova koji se može primijeniti transdermalno bez obzira na potencijalne prednosti tog načina primjene lijekova. Idealne karakteristike za uspješnu transdermalnu primjenu lijeka su: niska relativna molekulska masa ( $<500$  Da) i točka taljenja ( $<200$  °C), umjerena lipofilnost ( $\log P$  1-3) i topljivost u vodi ( $>1$  mg/mL) te visoka farmakološka potentnost. Penetrant primjenjen na površinu kože ima tri potencijalna puta prijenosa: kroz folikule dlaka i lojne žlijezde - pilosebacealno; kroz žlijezde znojnice - transsudoriferalno; ili direktno kroz epidermis – transepidermalno (Slika 1). Frakcijska površina privjesaka kože iznosi svega 0,1% stoga ovaj put čini zanemariv doprinos u prijenosu djelatne tvari u i kroz kožu. Međutim, ovaj put može pridonijeti u ranoj fazi primjene lijeka i prijenosu djelatne tvari te može biti važan put za velike polarne molekule, polimere i koloidne čestice koje ne mogu odmah difundirati kroz rožnati sloj (lat. *stratum corneum*). Iako je rožnati sloj sastavljen od svega 10-15 slojeva keratinocita on čini učinkovitu barijeru za penetraciju. Slični strukturi „cigle i žbuke“. Keratinociti ("cigle") su ispunjeni keratinom, između se nalazi međustanični prostor ("žbuka"), koji se uglavnom sastoji od dugolančanih ceramida, slobodnih masnih kiselina, triglicerida, kolesterola, kolesterol sulfata i sterol/voštanih estera. Općenito je prihvaćeno da je međustanični lipidni prostor glavni put penetracije kroz rožnati sloj za većinu molekula. Unutar epidermisa (pokoža) i dermisa (koža) brojne proteaze mogu uzrokovati enzimsku razgradnju peptida i proteina. Međutim proteolitička aktivnost enzima u koži je znatno manja od one u probavnom sustavu ili enzimskog metabolizma u jetri pa su transdermalnim putem primjene peptidi izloženi manjim promjenama. Potencijalnu metaboličku aktivnost u koži svakako treba uzeti u obzir kod dizajniranja lijekova za transdermalnu primjenu i određivanja doze aktivnog peptida koja mora biti isporučena do ciljne stanice (Benson i Namjoshi, 2008).

#### 1.1.1. BARIJERA POVRŠINE KOŽE

Jedna od glavnih uloga kože je da čini učinkovitu i selektivnu barijeru koja štiti ljude ili životinje od izloženosti različitim tvarima. Posebno, vanjski sloj epiderme, rožnati sloj, pruža znatnu prepreku transdermalnoj apsorpciji koja određuje brzinu penetracije kroz kožu. Brojni



drugi čimbenici kao što su kontaktna površina (mjesto i veličina), trajanje izloženosti, lipofilnost, molekularna masa, koncentracija, integritet rožnatog sloja, čvrstoća epidermisa, te smjesa u kojoj se kemikalija nalazi, također utječu na propusnost tvari kroz kožu. Rožnati sloj različit je od ostatka epidermisa jer je građen od mrtvih rožnatih stanica (korneocita) i intracelularnog lipidnog matriksa. Pokazalo se da sastav podloge može utjecati na permeabilnost kroz kožu raznim mehanizmima uključujući delipidizaciju, hidrataciju, fluidizaciju i poremećaj dezmosoma u rožnom sloju. Ti procesi mogu mijenjati polarnost pripravka što utječe na topljivost pa se stoga mijenja i termodinamička aktivnost penetranta. Posljedično, to utječe na raspodjelu penetranta iz podloga u rožnati sloj. Hidrofilna svojstva kože rastu prema dubljim slojevima kože. Žive slojeve epidermisa čine zrnasti sloj (lat. *stratum granulosum*), trnasti ili nazubljeni sloj (lat. *stratum spinosum*) i bazalni sloj (lat. *stratum basale*), a svaki od njih je značajno hidrofilan. Dermis je također hidrofilan što pogoduje unosu hidrofilnih supstanci (Karadzovska i sur., 2013).



**Slika 1.** Mogući putevi prijenosa aktivne tvari preko barijere kože (Benson i Namjoshi, 2008).

### 1.1.2. ROŽNATI SLOJ KOŽE – GLAVNA BARIJERA DERMALNOJ APSORPCIJI BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI

Rožnati sloj je vanjski sloj epidermisa. U procesu ljuštenja kože koji traje oko dva tjedna stanice migriraju iz dermalno-epidermalnog sloja preko bazalnog sloja do rožnatog sloja. Posljednja faza deskvamacije je diferencijacija epidermalnih keratinocita u plosnate, gusto pakirane rožnate stanice (korneocite) koje su uklopljene u dobro organiziran, lipidni matriks. Korneociti su građeni od: guste mreže keratina koja održava njihov oblik; smjese humektansa koji se zajedničkim imenom nazivaju prirodni čimbenici hidratacije (engl. *Natural Moisturizing Factor*; NMF), a pomažu održati rožnati sloj hidratiziranim tj. omogućavaju vezanje vode; te u vodi netopljive stanične stijenke koja je građena od visoko umreženih proteina, uključujući lorikrin, involucrin i filagrin. Međustanični lipidni matriks uglavnom sadrži smjesu ceramida, kolesterola, triglicerida i masnih kiselina raspoređenih u lipidnim lamelama. Relativni omjer i točna struktura tih spojeva još uvijek su predmetom istraživanja. Niži slojevi epidermisa su vijabilni i predstavljaju živi sloj pokožice, dok stanice rožnatog sloja nisu vijabilne i odljušćuju se tijekom diferencijacije. Struktura rožnatog sloja nalik „cigli i žbuci“ je prvenstveno odgovorna za njegovu učinkovitu fizikalno-kemijsku barijeru kako protiv penetracije egzogenih tvari u kožu tako i protiv izlaska endogenih tvari iz kože. Valja napomenuti kako nedostaci u strukturi rožnatog sloja (npr. struktura stanica) vjerojatno utječu na značajke prijenosa tvari, iako nije točno poznato u kojoj mjeri (Jepps i sur., 2013). Moguće su i interakcije između sirovina (primjerice, oleinska kiselina, etanol) i elemenata rožnatog sloja. Takve komponente mogu utjecati na propusnost tvari u međustanične lipide rožnatog sloja. Nekoliko recentnih publikacija procjenjuje učinke kemijskih pojačivača na penetraciju i bilo bi dobro da se uzmu u obzir zbog dodatnih informacija. Podloge (vehikli) koje ostaju na površini kože također mogu vezati lipide rožnatog sloja i tako mijenjati propusnost tvari. Tvari se vežu i na razne druge sastojke rožnatog sloja i tako tvore depoe (Karadzovska i sur., 2013). Kako smo već vidjeli, rožnati sloj predstavlja glavnu fizičku barijeru, tako da za permeaciju tvari kroz kožu i difuziju istih predstavlja ograničavajući korak. Nasuprot tome, on također predstavlja i glavnu barijeru za gubitak vode iz kože. Stanice rožnatog sloja (korneociti) su bez staničnih elemenata (organela), spljoštene, a sastoje se od amorfnog proteinskog matriksa okruženog gustom tvari, koja je bogata sumporom, potom je sve obavijeno višeslojnom staničnom membranom. Korneociti su povezani dezmosomima, koji tvore intercelularne mostove i tako omogućavaju kontakt među stanicama te održavaju njihov oblik, a time i tvrdi vanjski sloj. Ako se zbog nekog razloga razore takvi mostovi, dolazi do deskvamacije rožnatog sloja i do znatno veće propusnosti kože. Prijenos tvari kroz rožnati sloj uglavnom se odvija pasivnom difuzijom

te se temelji na njegovoj strukturi. Površina rožnatog sloja je tanka (0,4-10  $\mu\text{m}$ ), sastoji se od nepravilnih i nepovezanih stanica, sebuma koji luče žlijezde lojnice, znoja, bakterija i mrtvih stanica. Smatra se da taj sloj čini neznatnu barijeru za permeaciju tvari kroz rožnati sloj. Većina penetrirana preferira intercelularni put prijenosa. Male molekule se mogu slobodno gibati unutar međustaničnog prostora, a brzina difuzije uvelike ovisi o njihovoj lipofilnosti, ali i o fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su molekularna masa ili volumen, topljivost te sposobnost stvaranja vodikovih veza. Međutim, slobodno gibanje makromolekula ili čestica unutar lipidnih kanala je fizički ograničeno promjerom pora (19-75 nm). To ukazuje da za takve tvari rožnati sloj predstavlja dodatnu barijeru, dok za male molekule rožnati sloj ne predstavlja nikakvu barijeru. Stanice na površini rožnatog sloja nisu povezane (lat. *stratum corneum disjunctum*) pa one podliježu deskvamaciji, te na taj način dopuštaju da novostvorene stanice iz germinativne zone dođu na površinu kože (engl. *turnover*) u periodu od 14 dana, a ovisno o anatomske građi i dobi. Stoga takve stanice smatramo stalno obnovljivom barijerom koja inherentnim mehanizmom sprječava penetraciju stranih tvari u kožu. Kontinuirana migracija i klizanje korneocita s površine može pomoći u eliminaciji raznih patogena, kancerogenih stanica ili čvrstih čestica. Smatra se da polarne i nepolarne tvari permeiraju kroz rožnati sloj različitim putevima. Polarne tvari putuju transcelularnim putem, a nepolarne tvari više preferiraju intercelularni put. Poteškoće u raspodjeli tvari između lipofilnih i hidrofilnih odjeljaka rožnatog sloja rezultiraju činjenicom da se ovaj put smatra neuspješnim u većini slučajeva. To je potkrijepljeno histokemijskim i teorijskim dokazima koji pokazuju da je difuzija kroz intercelularne lipide bolji odabir za većinu otopljenih tvari. Bez obzira na nedavnu reafirmaciju važnosti transcelularnog puta čak i za lipofilne tvari, transcelularni put i dalje je predmetom diskusije. Najveći fokus je stavljen na folikule dlaka pa se isporuka lijeka ili čestica putem privjesaka smatra realnim alternativnim putem isporuke kroz rožnati sloj. Folikuli dopiru duboko u kožu, a debljina rožnatog sloja se postupno smanjuje prema unutrašnjosti kože, koja je ujedno i bogata kapilarama koje mogu prenijeti otopljene tvari iz folikula. Postoji značajan interes za ciljanu folikularnu isporuku prilagođenih oblika lijekova ili nanočestica. Također, postoje i prijedlozi da se raspodjela lijeka unutar sebuma uzme kao potencijalni put isporuke lijeka. Prije sedamdeset godina provedeno je mjerenje na ljudima i zaključeno je da je površina kože kisela, tj. da pH površine kože iznosi od 4,2-5,6. Takva kiselost površine kože, nazvana je kiseli plašt. pH površine kože ovisi o spolu i položaju na kojem se mjeri, prisutnosti znoja, sebuma i hidrataciji. Definiran je i precizan gradijent kroz rožnati sloj pa se već u višim slojevima zrnastog sloja pH približava neutralnom. Koristeći dvofotonski fluorescencijski prikaz apliciran je pH ovisan fluorofor na površinu rožnatog sloja ćelavog miša i utvrđeno je

da postoje kisele mikrodomene u izvanstaničnom matriksu, koje su sve rjeđe prema živim slojevima epidermisa. Kiseli plašt ima brojne funkcije. Pruža antimikrobnu barijeru, održava permeabilnost barijere učincima na organizaciju izvanstaničnih lipida i njihovom obradom, čuva optimalni integritet i povezanost korneocita, inhibira oslobađanje proupalnih citokina reguliranjem pH osjetljivih proteolitičkih enzima i ograničavanjem upale. Postoji jasna veza između povišenog pH kože i bolesti, kao što je atopijski dermatitis, sa značajnim pH razlikama između zahvaćenog i nezahvaćenog područja kože bolesnika. U nekim slučajevima, kiseli pH površine kože može pružati barijeru i prema prodiranju nanočestica. Karboksilirane se nanočestice stiropora agregiraju zbog smanjenja elektrostatskih sila kada se pH otopine smanji, a agregati u manjoj mjeri mogu penetrirati u rožnati sloj. S druge pak strane, održavanjem integriteta i povezanosti rožnatog sloja uklopljene čestice će manje odumirati tijekom procesa deskvamacije. Nadalje, za neke nanočestice, kao što je cinkov oksid, kiseli pH može znatno utjecati na njihovu agregaciju i kinetiku otapanja, a to uvodi zbrku u istraživanja penetracije tvari u kožu (Prow i sur., 2011).

### **1.1.3. BARIJERA ŽIVIH SLOJEVA EPIDERMISA**

Živi slojevi epidermisa su avaskularni, sastoje se uglavnom od keratinocita koji sadrže otprilike 40% proteina, 40% vode i 15-20% lipida. Žive slojeve epidermisa čine zrnasti sloj, trnasti ili nazubljeni sloj i bazalni sloj, a svaki od njih je značajno hidrofilan. Epidermis je povezan s dermisom bazalnom membranom (epidermokutana veza). To je vrlo složena struktura, koja prati valovitu papilarnu liniju, a građena je od trilamelarnih membrana bazalnih keratinocita i kolagenih fibrila koje usidruju epidermis o dermis. Stanice u bazalnom sloju epidermisa tvore najvažniju strukturnu i funkcionalnu vezu iznad dermisa. Stanice epidermisa podvrgnute su kontinuiranoj migraciji u procesu deskvamacije. Difuzija lijekova u živim slojevima epidermisa može se smatrati difuzijom kroz vodeni medij, a otežana je značajnom prisutnošću proteina i isprekidanim prijelazima staničnih membrana. Veliki udio vode u živim slojevima epidermisa predstavlja učinkovitiju barijeru lipofilnim spojevima koji imaju veći afinitet prema nepolarnim sredinama. Dokazano je da živi slojevi epidermisa pružaju značajnu prepreku prodiranju nesteroidnih protuupalnih lijekova iz lipofilnih podloga. Dokaze temelje na korelaciji između permeabilnosti kože i koeficijenta razdjeljenja između oktanol i PBS podloge. Drugi procesi u živim slojevima epidermisa koji utječu na penetraciju i raspodjelu lijeka u kožu uključuju vezanje i sekvestraciju lijeka unutar živih slojeva epidermisa, metabolizam lijeka i aktivni prijenos. Detaljan utjecaj vezanja lijeka, sekvestracije i metabolizma lijeka na njihovu penetraciju i raspodjelu nije uvijek dobro poznat, iako se općenito misli da oni mogu ograničiti prostor u kojem je lijek dostupan za permeaciju u niže slojeve. Eksperimentalni dokazi ukazuju da se epidermalni metabolizam odvija u bazalnom sloju i da taj metabolizam može odigrati veliku ulogu u sekvestraciji lijekova u živim slojevima epidermisa. Nedavno je uočeno da prisutnost keratina u živim slojevima epidermisa može utjecati na difuziju u žive slojeve epidermisa i/ili raspodjelu lijeka iz rožnatog sloja u žive slojeve epidermisa (Jepps i sur., 2013). Postojanje čvrste funkcionalne veze pokazano je na zrnastom sloju kože sisavaca, iako su mnogi konstitutivni proteini čvrstih veza identificirani i u drugim epitelnim slojevima, kao i u folikulima dlaka. Čvrsta veza se smatra važnim elementom epidermalne barijere. Pokazalo se da se lokalizacija i ekspresija proteina čvrste veze mijenja u bolestima koje su karakterizirane oštećenom kožnom barijerom, kao što je psorijaza (Prow i sur., 2011). Fizičku barijeru kože čini funkcija živih slojeva epidermisa kao kemijske i metaboličke barijere, s enzimima lokaliziranim u bazalnom sloju, te ekstracelularni prostor rožnatog sloja i privjesci kože u dermisu (Karadzovska i sur., 2013).

#### 1.1.4. DERMIS

Odmah ispod epidermisa nalazi se dermis. To je ujedno i najdeblja komponenta kože. Dijeli se na gornji papilarni (lat. *stratum papillare*) i donji retikularni dio (lat. *stratum reticulare*). Papilarni sloj je utisnut u epidermis i sastoji se od snopova kolagena, elastičnih vlakana, fibrocita i uglavnom sadrži vodu, elektrolite, plazmatske proteine te polisaharidne i polipeptidne komplekse. Sadrži i krvne kapilare, završetke živaca i osjetna tjelešca za dodir (Meissnerova tjelešca). U retikularnom sloju nalaze se gusti snopovi kolagena upleteni u mrežu elastičnih vlakana zatim krvne i limfne žile, živci, receptori za hladnoću (Krauseovi klipovi), žlijezde lojnice i mišić koji podiže dlaku (m. arrector pili). Ovaj sloj osigurava koži čvrstoću i žilavost (Čajkovac, 2002).

Slično kao i kod živih slojeva epidermisa, difuzija lijekova kroz dermis također je difuzija u vodenom mediju. No svejedno postoje važne razlike između ta dva sloja: vaskularizacija i limfni sustav dermisa značajno pridonose prijenosu lijekova i njihovoj raspodjeli u kožu; dermis je uglavnom bez stanica; i dermis pruža mnoge mogućnosti za vezanje i sekvencijalnu difuziju lijekova (Jepps i sur., 2013).

U ovom sloju kemijske komponente mogu direktno ili indirektno mijenjati vaskularni unos penetrirajućih tvari, što također može utjecati na dubinu i opseg penetracije u temeljna tkiva (Karadzovska i sur., 2013).

#### 1.1.5. FOLIKULI DLAKE

Folikule dlaka se smatralo beznačajnim putem dostave lijekova jer prekrivaju svega 0,1% površine kože. Međutim njihova izuzetna vaskularizacija i duboka invaginacija u kožu dovela je do preispitivanja takve tvrdnje. U tu svrhu je napravljen rad o procjeni doprinosa folikularnog puta penetracije lijekova, kao ciljne isporuke lijeka. Folikularna penetracija otopljenih čestica, pokazana je na liposomima s minoksidilom i fluorescentnim nanočesticama polistirena. Uočeno je da čestice od 300-600 nm penetriraju najbolje kroz folikule masažom. Zbog udaljenosti između ljuštaka dlaka, objašnjava da pomicanje kose (masaža) djeluje kao usmjerena pumpa koja gura čestice u folikule. Nakon što je prethodno dokazano da titan dioksid ne može penetrirati kroz folikule dlaka i da će biti eliminiran protokom sebuma, on smatra folikule dlaka dobrim spremnikom za isporuku nanočestica lijekova. Moguće je i da će neki folikuli dlaka biti blokirani ili zatvoreni sebumom te će otežati penetraciju čestica. Značajna penetracija

nanočestica veličine 40 nm kroz folikule dlaka u epidermalne stanice moguća je jedino kad je omotač dlake uklonjen (Prow i sur., 2011).

## **1.2. KOZMECEUTICI – BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U KOZMETIČKIM PRIPRAVCIMA**

### **1.2.1. ANTIOKSIDANSI**

#### **1.2.1.1. VITAMIN A**

Oblici vitamina A koje se najčešće koriste u kozmetičke svrhe su: retinol, esteri retinola (acetat, propionat, palmitat) i retinalaldehid. Djelovanjem endogenih enzima u organizmu svi prelaze u trans-retinoičnu kiselinu koja ujedno predstavlja i aktivni oblik vitamina A. Objavljeni literaturni podaci koji pokazuju mehanizam djelovanja trans-retinoične kiseline temelje se prvenstveno na *in vitro* eksperimentima. Interakcija trans-retinoične kiseline s proteinima nuklearnih receptora vodi do interakcije sa specifičnim sekvencama DNA te utječe na transkripciju što rezultira povećanjem ili smanjenjem ekspresije određenih proteina/enzima. Među brojnim promjenama ekspresije gena koje uzrokuju retinoidi, samo neke od njih imaju značajan učinak na sprječavanje starenja kože. Takve promjene su: povećanje epidermalne proliferacije i diferencijacije (povećanje epidermalne debljine), povećanje produkcije epidermalnih tvari (glikozaminoglikana koji vežu vodu i tako povećavaju debljinu i hidrataciju epidermisa), povećanje produkcije komponenti izvanstaničnog dermalnog matriksa kao što je kolagen (povećanje debljine dermisa). Uslijed takvih promjena dolazi do smanjenja finih linija i bora. Osim stimulacijskih učinaka, retinoidi također imaju i inhibitorne učinke. Reduciraju produkciju kolagenaza, inhibiraju proizvodnju viška tvari koje uzrokuju fotostarenje kože. Retinoidi također smanjuju ekspresiju tirozinaze, ključnog enzima u pretvorbi tirozina u melanin. Topikalno primjenjeni retinoidi (npr. trans-retinoična kiselina) pokazuju vrlo brzo učinke na epidermis, stoga se i smanjenje finih linija očekuje već nakon par dana od primjene proizvoda. Učinci na dermis javljaju se tek za nekoliko tjedana pa čak i mjeseci pa se i smanjenje dubokih bora očekuje u tom periodu. Većina istraživanja se temelji na učinkovitosti topikalne primjene retinoične kiseline u smanjenju bora. Međutim, istraženi su i drugi oblici vitamina A poput retinola i retinil-palmitata. Općenito, retinoidi su vrlo potentne tvari, pa je za topikalnu primjenu doza manja od 1% dovoljna da bi se ostvarili značajni učinci. Niske doze korištenog retinola i retinil-palmitata u kliničkom ispitivanju u trajanju od 12 tjedana dale su značajne rezultate na smanjenje facijalnih bora i hiperpigmentacije. Rad s retinoidima ima dva

temeljna problema. Prvi problem je njihova tendencija izazivanja iritacije kože, a drugi problem leži u njihovoj nestabilnosti, pogotovo uz prisutnost kisika i svjetlosti. Na smanjenje prvog problema možemo utjecati odabirom retinoida. Koža bolje podnosi retinol od trans-retinoične kiseline, retinalaldehid uzrokuje iritaciju slično kao i retinol, dok se esteri retinola podnose bolje od samog retinola. Iritacija može biti ublažena i oblicima koji kontroliraju isporuku ili uključivanjem drugih sastojaka u oblikovanje, kao što su protuupalna sredstva. Da bi riješili drugi problem, konačni proizvod mora biti idealno oblikovan i zapakiran da je što manje izložen kisiku i svjetlosti (Bissett, 2009).

#### **1.2.1.2. VITAMIN B3**

Osnovni oblici vitamina B3 koji se koriste u kozmetičkim proizvodima su niacinamid (nikotinamid), nikotinska kiselina i esteri nikotina. Vitamin B3 je esencijalni vitamin. Prekursor je endogenih enzimskih kofaktora, nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD), njegovog fosforiliranog derivata NAD(P) te njihovih reduciranih formi NAD(H) i NAD(PH), koji imaju svojstva antioksidansa. Ovi kofaktori sudjeluju u mnogim enzimskim reakcijama i tako utječu na mnoge procese u koži. Upravo takva raznolikost procesa u kojima sudjeluju odgovorna je za razne učinke lokalno primijenjenih proizvoda. Međutim, treba imati u vidu da se neki mehanizmi niacinamida temelje isključivo na *in vitro* istraživanjima, pa tako njihov učinak nije u potpunosti razjašnjen. Nikotinska kiselina i njeni esteri također su prekursori NAD(P) pa imaju i slične učinke na kožu. Topikalna primjena niacinamida značajno poboljšava boju kože, tj. smanjuje pojavu hiperpigmentnih mrlja i crvenila. Učinci koji se javljaju nakon duže primjene su poboljšanje kožne barijere, smanjenje osjetljivosti kože na razne tvari iz okoliša, kao što su npr. tenzidi. Za ostavriavanje takvih učinaka korištene su prilično visoke doze vitamina B3 (2-5%). Tako visoke doze se mogu koristiti zahvaljujući visokoj toleranciji kože na niacinamid, pa čak i kod dugoročne primjene. Najveći izazov u radu s niacinamidom i esterima nikotinske kiseline je kako izbjeći njihovu hidrolizu do nikotinske kiseline. Nikotinska kiselina, čak i u malim dozama, može izazvati intenzivno crvenilo kože. Da bi se izbjegla hidroliza preporuča se da pH proizvoda bude od 4 do 9. Zbog toga, proizvodi koji imaju oboje i niacinamid i kiselinu (npr. salicilna kiselina) ili bazu (cinkov oksid) su problematični (Bissett, 2009).



### 1.2.1.3. VITAMIN C

Mnogo je oblika vitamina C, a najčešće korišteni oblici su askorbinska kiselina, askorбил fosfat, askorбил palmitat i askorбил glukozid. Zbog svog antioksidativnog djelovanja i inhibicije tirozinaze, vitamin C je često korišten kao tvar za osvjetljivanje (osvježanje) kože. Zbog toga što smanjuje pojavu eritema nakon primjene lasera, poznat je i kao protuupalno sredstvo. Askorbinska kiselina je i bitan kofaktor za lizil- i prolil-hidroksilaze, enzime koji su potrebni u procesima posttranslacije biosinteze kolagena. Sudjelovanjem u ovim biosintetskim koracima, askorbinska kiselina ima veliki značaj u proizvodnji kolagena, koji onda posljedično smanjuje bore. U nekoliko kozmetičkih ispitivanja, dokazano je da spojevi askorbata imaju učinak na starenje kože. U ispitivanjima su korištene doze vitamina C u rasponu od 3% do 17%. Jedno istraživanje je pokazalo da topikalna primjena 3% askorbinske kiseline kroz 1 tjedan na ljudskoj koži značajno smanjuje oksidaciju stanica uzrokovanu UVA zračenjem, dok je smanjenje oksidacije s 3% natrij askorбил fosfatom bilo znatno manje. Kliničko ispitivanje provedeno kroz 12 tjedana, pokazalo je da koža dobro podnosi dozu od 3% askorbinske kiseline, primijenjene topikalno i da ta doza smanjuje bore na licu. Drugo istraživanje je pokazalo, da primjena visokih doza askorbinske kiseline (5-17%) u periodu od 12 tjedana do 6 mjeseci smanjuje fotostarenje kože, poboljšava teksturu kože te povećava količinu kolagena i elastina u koži. Glavni problem u radu s vitaminom C i njegovim derivatima je njihova stabilnost tj. osjetljivost na kisik. Na ovaj problem nastojalo se odgovoriti raznim pokušajima stabilizacije kao što je potpuna odsutnost kisika tijekom oblikovanja, ambalažom koja ne propušta kisik, uklapanjem, niskim pH, minimalizacijom vode u pripravku, te uključivanjem drugih antioksidansa. Bez obzira na takve strategije, stabilnost vitamina C i dalje predstavlja probleme u oblikovanju proizvoda, a neki pokušaji, kao što je niski pH, čak mogu dovesti do neželjenih estetskih učinaka. Askorбил glukozid ima dokazanu stabilnost pa on može doprinijeti lakšem oblikovanju proizvoda, međutim njegov je problem cijena jer je značajno skuplji od askorbinske kiseline. Problem predstavlja i isporuka vitamina C u kožu. Penetracija askorbinske kiseline je slaba, uglavnom manje od 1% topikalno primijenjene doze penetrira u kožu pa je iz tog razloga nužan pristup i u poboljšanju penetracije vitamina C (Bissett, 2009).

#### **1.2.1.4. VITAMIN E**

U kozmetičke svrhe, oblici vitamina E koji se uglavnom koriste su tokoferol, tokoferil acetat, te nekoliko estera npr. sukcinat, nikotinat, fosfat. Prirodni tokoferol ima nekoliko izomera (alfa, beta, gama i delta) koji se razlikuju u nekoliko bočnih lanaca te time imaju i različite potencijalne učinke. Najviše isplativ oblik je sintetski proizveden alfa-tokoferol. Vitamin E je antioksidans koji je topljiv u mastima. Vitamin E sprječava i poboljšava kožne probleme, akutne i kronične, koji su uzrokovani slobodnim kisikovim radikalima. Tako pozitivno djeluje na probleme koje uzrokuje izloženost UV zračenjem, kao što su opekline, bore i hiperpigmentacija. Topikalno primijenjena doza od 2% vitamina E učinkovita je u ukljanjanju crvenila izazvanog UV-zračenjem. Doza od 5% topikalno primijenjenog vitamina E ima zaštitni faktor. Istraživanje provedeno kroz 4 mjeseca s 5% topikalno primijenjenog vitamina E pokazalo je učinkovitost na bore u području oka. Sukladno tome, zaključeno je da visoke doze vitamina E imaju značajne učinke na kožu. S obzirom da su tokoferol i tokoferil acetat topljivi u lipidima, glavni izazov u oblikovanju je kako napraviti nemasan oblik (Bissett, 2009).

#### **1.2.1.5. PANTENOL (PROVITAMIN B5)**

Deksapantenol je D izomer pantenola i predstavlja prekursor pantotenske kiseline (vitamin B5). S obzirom da je pantenol prekursor pantotenske kiseline, njegovi učinci na kožu proizlaze upravo iz te uloge. Pantotenska kiselina je sastavio dio koenzima A koji ima značajnu ulogu u staničnom metabolizmu, uključujući prijenos acilne grupe u biosintezi masnih kiselina i glukoneogenezi. Povećanjem sinteze lipida rožnatog sloja, poboljšava se njegova barijerna uloga. Također potiče i proliferaciju fibroblasta i epidermalnu reepitelizaciju u *in vitro* uvjetima, a koji bi mogli pomoći u zacjeljivanju rana. S obzirom da je topljiv u vodi i higroskopan ima veliki potencijal vlaženja kože, pogotovo u kombinaciji s glicerolom. S obzirom da koža dobro podnosi pantenol i da topikalna primjena ne izaziva nikakve iritacije kože (crvenilo, suhoća, svrbež) primijenjuje se često u lokalnoj upotrebi i pokazuje brojne učinke na kožu. Neki od učinaka su vlaženje ili hidratacija rožnatog sloja te smanjenje hrapavosti i poboljšanje epidermalne elastičnosti. Sprječava iritacije i oštećenja površine kože izazvane natrij-lauril sulfatom te na taj način pridonosi učinkovitosti barijere kože. Djeluje protuupalno i antipruritički te umiruje kožu (npr. smanjuje eriteme izazvane UV-zračenjem). Također smanjuje i nuspojave izazvane retinoidima. Učinak na hidrataciju doveo je i do njegove primjene u njezi kose i to do poboljšanja elastičnosti kose, njenog omekšavanja i lakšeg

raščešljavanja. Neki potrošači pokazuju osjetljivost na određene konzervanse, mirise i filtre u proizvodima za zaštitu od sunca, a pantenol uklopljen u takve proizvode smanjuje takvu osjetljivost. Mehanizam kojim će točno djelovati nije poznat, ali se pripisuje njegovom protuupalnom učinku. Kod oblikovanja proizvoda s pantenolom treba paziti na temperaturu jer visoke temperature mogu dovesti do konverzije D-pantenola u L-pantenol čime se gubi njegova aktivnost. Ako se koriste velike količine pantenola treba paziti na ljepljivost proizvoda (Bissett, 2009).

#### **1.2.1.6. ALFA-LIPOIČNA KISELINA**

Alfa-lipoična kiselina snažan je antioksidans koji je topljiv i u lipidima i u vodi te uništava djelovanje svih vrsta slobodnih kisikovih radikala. Topikalna primjena kreme s 5% lipoične kiseline procjenjivana je kliničkim ispitivanjima na uzorku od 33 žene. Žene su kremu koristile dva puta dnevno kroz 12 tjedana te je uočeno da značajno smanjuje hrapavost kože i fine bore ( $P < 0,001$ ) (Dahiya i Romano, 2006).

#### **1.2.1.7. UBIKINON ILI KOENZIM Q10**

Ubikinon ili koenzim Q10 je antioksidans prisutan u svim stanicama koje sudjeluju u pretvaranju energije. Topikalno primijenjen ubikinon može prodrijeti kroz žive slojeve epidermisa i smanjiti dubinu bora. Također je djelotvoran protiv UVA-posredovanog oksidativnog stresa keratinocita te može značajno smanjiti ekspresiju kolagenaze u dermalnim fibroblastima nakon UV-zračenja. Uporaba kreme s 0,3% ubikinona jednom dnevno kroz 6 mjeseci rezultirala je smanjenjem dubine bora za 27% (Dahiya i Romano, 2006).

#### **1.2.1.8. KINETIN**

Kinetin ili N6-furfuriladenin je biljni čimbenik rasta koji ima značajna antioksidativna svojstva. Dodatak kinetina u kulturu fibroblasta odgađa nastup i umanjuje obim mnogih karakterističnih promjena uzrokovanih starenjem u kulturi fibroblasta. Inicijalna ispitivanja daju naslutiti da korištenje losiona s kinetinom dva puta dnevno kroz 24 tjedna može smanjiti hrapavost kože, hiperpigmentaciju i bore na licu (Dahiya i Romano, 2006).

## **1.2.2. BILJNE TVARI I PRIPRAVCI**

### **1.2.2.1. EKSTRAKT ZELENOG ČAJA**

Polifenoli zelenog čaja imaju antioksidativna i protuupalna svojstva. Iako je na miševima pokazano kako zeleni čaj štiti od karcinogeneze izazvane UV zračenjem, postoji mali broj ispitivanja koja proučavaju njegovo djelovanje na ljudskoj koži. U kliničkom istraživanju na uzorku od 40 žena s umjerenom izraženosti fotostarenja kože, kombinacijom korištenja kreme s 10% zelenog čaja i uzimanjem dva puta dnevno oralne suplementacije zelenog čaja (300 mg) kroz 8 tjedana rezultiralo je poboljšanjem u sastavu elastičnog tkiva u odnosu na placebo, iako nikakve kliničke promjene nisu uočene. Potrebna su daljnja istraživanja prije nego se utvrdi da zeleni čaj djeluje kao inhibitor fotooštećenja na ljudskoj koži (Dahiya i Romano, 2006).

### **1.2.2.2. SOJINI IZOFLAVONI**

Genistein, izoflavon izoliran iz soje, još je jedan koristan antioksidans. Istraživanja na životinjama pokazala su antikancerogeno djelovanje oralno primijenjenog genisteina, a što se može povezati s inhibicijom tirozin kinaze. Topikalno primijenjen genistein kod miševa inhibirao je tumore kože izazvane UVB-zračenjem te je blokirao akutne kožne opekline i bore izazvane UVB-zračenjem. Također, topikalna primjena genisteina na ljudskoj koži može smanjiti eriteme izazvane UVB-zračenjem (Dahiya i Romano, 2006).

## **1.2.3. HIPOPIGMENTIRAJUĆE TVARI**

### **1.2.3.1. HIDROKINON**

Hidrokinon, inhibitor aktivnosti tirozinaze, najčešće je korištena hipopigmentirajuća tvar. Najviša koncentracija koju je odobrila FDA za upotrebu u kozmetici je 2%, a veće doze su dostupne uz recept. Ovaj fenolni spoj u prirodi se može naći u mnogim biljkama kao i u kavi, čaju, pivi i vinu. Problem kod upotrebe hidrokinona je što može izazvati kontaktni dermatitis te rjeđe ohronozu, rezultirajući hiperpigmentacijom na tretiranom području koju je poslije teško izliječiti (Dahiya i Romano, 2006).

### **1.2.3.2. ALOESIN**

Aloesin je prirodni derivat aloe vere koji inhibira aktivnost tirozinaze te se istražuje kao alternativa hidrokinonu (Dahiya i Romano, 2006).

### **1.2.3.3. KOJIČNA KISELINA**

Kojična kiselina je u prirodi dostupna, dikarboksilna kiselina izolirana iz gljive *Pityrosporum ovale*. Inhibira aktivnost tirozinaze, mitohondrijske oksidoreduktaze te sintezu DNA. U svrhu poboljšanja hiperpigmentacije, kojična kiselina koristi se topikalno dva puta dnevno u razdoblju od 3 do 12 mjeseci te u jačini od 15% ili 20%. Neka istraživanja pokazala su da kojična kiselina u odnosu na hidrokinon pokazuje puno bolje učinke u liječenju melasme, dok druga istraživanja nisu uočila značajne razlike. Piling glikolnom kiselinom u koncentracijama od 30% do 70% može poboljšati penetraciju topikalno primijenjenih hipopigmentirajućih tvari skidanjem površinskih slojeva epidermisa. Kombinacijom steroida i kojične kiseline u topikalnoj primjeni mogu se smanjiti iritacije koje kojična kiselina često izaziva. U jednom istraživanju, upotreba kombinacije 0,05% hidrokinona, 10% glikolne kiseline i 2% kojične kiseline pokazala se mnogo učinkovitijom u liječenju melasme od primjene kombinacije 2% hidrokinona i 10% glikolne kiseline (Dahiya i Romano, 2006).

## **1.2.4. DRUGI ZNAČAJNI KOZMECEUTICI**

### **1.2.4.1. HIDROKSILNE KISELINE**

Hidroksilne kiseline dijele se na  $\alpha$ -hidroksilne kiseline,  $\beta$ -hidroksilne kiseline i polihidroksilne kiseline. U  $\alpha$ -hidroksilne kiseline (AHA) spadaju glikolna, jabučna, vinska, mliječna i limunska kiselina. U  $\beta$ -hidroksilne kiseline (BHA) ubrajamo salicilnu kiselinu i njene alkil derivate (npr. oktanoil salicilna kiselina). Glukonolakton i laktobionska kiselina pripadaju grupi polihidroksilnih kiselina. Iako nije hidroksilna kiselina, piruvična kiselina ( $\alpha$ -keto kiselina) pripada takvoj skupini spojeva. Mehanizam djelovanja uključuje eksfolijaciju rožnatog sloja, najvjerojatnije kelatiranjem kalcija koji sudjeluje u međustaničnoj koheziji. Ubrzana eksfolijacija rezultira poboljšanjem teksture i boje površine kože.  $\alpha$ -hidroksilne kiseline (npr. mliječna kiselina i njene soli) imaju sposobnost vlaženja kože pa se koriste u liječenju suhe kože. Ispitivanje 1,5% salicilne kiseline na koži podlaktice kroz 18,5 dana rezultiralo je povećanjem prometa novostvorenih stanica do rožnatog sloja dok je kontrolnoj podlozi za isti

proces bilo potrebno 21,5 dana. Procjenom samih dobrovoljaca te procjenom slika dobrovoljaca od strane stručnih ocjenjivača brži *turnover* dovodi do poboljšanja glatkoće i boje kože lica. Uočeno je i da tretman sa salicilnom kiselinom ne uzrokuje značajno crvenilo kože i transepidermalni gubitak vode. Ono na što treba obratiti pažnju kod oblikovanja proizvoda je moguća iritacija kože. Koža dobro podnosi takve spojeve, međutim visoke koncentracije kod niskog pH mogu uzrokovati nadraženost i potencijalnu osjetljivost kože (Bissett, 2009).

#### **1.2.4.2. PEPTIDI**

Zbog mogućih različitih slijedova aminokiselina u peptidima i zbog njihovih različitih derivata, broj peptida je neograničen. Peptidi s poznatim slijedom aminokiselina koji su posebno značajni u kozmetičkoj industriji su matriksil (pal-KTTKS; palmitoil-lisin-treonin-treonin-lizin-serin), argirelin (Ac-EEMQRR; acetyl-glutamat-glutamat-metionin-glutamin-arginin-arginin) i tripeptid bakra glicin-histidin-lizin (Cu-GHK). Peptid pal-KTTKS čini fragment ljudskog kolagena koji stimulira produkciju novog kolagena te sudjeluje u procesima cijeljenja rane. Sintetski pal-KTTKS također stimulira produkciju kolagena u *in vitro* uvjetima. U ekstremno niskim dozama (ppb) u kulturi pal-KTTKS smanjuje višak glikozaminoglikana, a to može pridonijeti smanjenju bora. Poput matriksila, GHK također čini fragment kolagena. Bakar je potreban za aktivaciju lizil-oksidade, enzima koji je uključen u sintezu kolagena. Kompleks bakra i GHK (Cu-GHK) stimulira procese cijeljenja rane na staničnim modelima povećanjem proizvodnje kolagena i remodeliranjem specifičnih metaloproteinaza matriksa. Ac-EEMQRR je opisan kao imitacija botulinum neurotoksina (botox) koji inhibira oslobađanje neurotransmitora i tako opušta mišiće koji su uključeni u stvaranje bora. Peptid pal-KTTKS je dosta potentan, tj. svoj učinak pokazuje u vrlo niskim dozama. Niska doza koja se koristi u kozmetičke svrhe u skladu je sa vrlo niskim koncentracijama u *in vitro* uvjetima. U kliničkom ispitivanju topikalno primijenjen peptid pal-KTTKS u koncentraciji od 3 ppm pokazao je učinke na naboranoj koži. Na ispitanicima takva doza i način primjene pokazali su se jako učinkovitim i nisu izazvali nikakve iritacije kože (nije bilo crvenila, suhoće, opekline, svrabeži). Također takva doza nije utjecala na funkcije kožne barijere, kao što je transepidermalni gubitak vode, što ukazuje na nedostatak iritacije. Drugi peptidi zahtijevaju primjenu znatno većih doza, pa za Cu-GHK doza iznosi 2%, a za Ac-EEMQRR 10%. Serija istraživanja u trajanju od 12 tjedana topikalne primjene 2% Cu-GHK pokazala su njegovu djelotvornost na debljinu kože, hidrataciju, zaglađenost kože i bore. Istraživanje kroz 30 dana pokazalo je da doza od 10%

topikalno primjenjenog Ac-EEMQRR reducira dubinu bora za 30%. Važan problem u oblikovanju proizvoda je njihova dostava u kožu jer peptidi slabo penetriraju, pogotovo kako se broj aminokiselinskih ostataka povećava. Da bi se taj problem riješio dodaju se lipofilni lanci (npr. palmitat) koji mogu značajno povećati penetraciju u odnosu na nederivatizirane peptide. Drugi problem je cijena peptida. Kako se povećava broj aminokiselinskih ostataka, cijena se može dramatično povećati. Posljedica toga je da samo mali broj peptida može biti korišten u proizvodnji, a da su prihvatljive potentnosti i cijene za potrošača (Bissett, 2009).

#### 1.2.4.3. ŠEĆERNI AMINI

Najpoznatiji oblici šećernih amina, korišteni u kozmetičke svrhe su glukozamin i N-acetil glukozamin (NAG). Glukozamin i NAG prekursori su hijaluronske kiseline, koja ima značajnu ulogu vezanja vode u epidermisu i dermisu. Topikalna primjena takvih spojeva povećava vlažnost kože i pridonosi smanjenju finih linija i bora. NAG je eksfolijant te ometa poprečno povezivanje korneocita. U *in vitro* uvjetima glukozamin inhibira glikozilaciju proteina, inhibira pretvorbu protirozinaze u aktivni enzim tirozinazu te tako inhibira stvaranje melanina. Takvi spojevi također imaju i protuupalni učinak. Istraživanje topikalne primjene NAG pokazalo je da on smanjuje proizvodnju melanina, povećava stvaranje hijaluronana, a genska analiza je pokazala promjenu u ekspresiji gena koji sudjeluju u pigmentaciji kože. Kod pojedinaca koji imaju suhu i hrapavu kožu, oralno primijenjen NAG je značajno utjecao na hidrataciju kože. Topikalna primjena 2% NAG iznimno je učinkovita u reduciranju finih linija i bora u području oka, te u smanjenju hiperpigmentnih mrlja na licu i podlaktici. U radu s glukozaminom, izazov predstavlja njegova stabilnost što se vidi iz Maillardovae reakcije koja pokazuje da nastaje smeđi polimerni produkt. Takav se problem donekle može riješiti upotrebom antioksidansa i kiselog pH. NAG je značajno stabilniji od glukozamina pa njegova stabilnost ne predstavlja izazov u oblikovanju proizvoda. Oba spoja, u visokoj dozi mogu biti ljepljiva što rezultira estetskim negativnostima (Bissett, 2009).

#### **1.2.4.4. CERAMIDI**

Ceramidi su osnovni, neophodni lipidi u rožnatom sloju koji pružaju vodenu barijeru. Primijenjeni izvana inkorporiraju se u međustanične lipide rožnatog sloja te popravljaju oštećenja uzrokovana starenjem i različitim štetnim okolišnim čimbenicima (npr. tenzidi). Dokazano je da topikalno primijenjeni ceramidi smanjuju transepidermalni gubitak vode te poboljšavaju barijernu funkciju rožnatog sloja i popravljaju oštećenja kože. Poboljšanjem barijerne uloge smanjuje se osjetljivost kože te se povećava otpornost prema oštećenjima iz okoliša. S obzirom da su ceramidi topljivi u lipidima, u niskim dozama se mogu uklopiti u uljnu fazu proizvoda bez poteškoća. Međutim, izazov može predstavljati cijena ako se koriste u visokim koncentracijama (Bissett, 2009).

#### **1.2.4.5. METALI**

U kozmetičkim pripravcima koristi se samo nekoliko metala, a to su cink, bakar, selen, stroncij, magnezij i mangan. Koriste se u obliku soli ili u kompleksu s organskim molekulama. Metali imaju specifične uloge u koži. Često su prisutni kao kofaktori u djelovanju metaloenzimaza, a mehanizam djelovanja je različit za različite metale. Cinkov piriton i selenov sulfid djeluju kao antifungalne tvari i učinkoviti su u djelovanju protiv peruti. Cink je u koži vezan sa superoksid dismutazom i metalotioneinom pa cinkov oksid djeluje kao potencijalni antioksidans tj. služi kao izvor cinka koji je potreban za sintezu takvih proteina. Bakar također sudjeluje kao kofaktor mnogih enzima, uključujući lizil oksidazu i prolil hidroksilazu, enzima koji su važni u sintezi kolagena. Selen je kofaktor enzima glutathion peroksidaze i tioredoksin reduktaze koji djeluju kao antioksidansi u stanici. Cinkov oksid pozitivno djeluje na iritacije kože. Ispitivanje na dijelu podlaktice pokazalo je da cinkov oksid značajno utječe na iritacije kože izazvane raznim onečišćenjima iz okoliša. Kombinacija cinka i niacinamida pokazala se korisnom u rješavanju niza upalnih promjena na koži. Lokalna primjena bakar-peptid kompleksa učinkovita je protiv starenja kože. Selenometionin smanjuje eriteme uzrokovane UV-zračenjem i smanjuje bore na licu. Neki metali i njihovi kompleksi su obojani pa to predstavlja estetski problem ako se primjenjuju u visokim dozama. Metalne soli mogu negativno utjecati na tvari za zgušnjavanje što onda zahtijeva znatne prilagodbe u oblikovanju. U proizvodima za zaštitu od sunca, cink može kompleksirati sa avobenzonom, što dovodi do njegove kristalizacije i žutila proizvoda te značajnog smanjenja zaštitnog faktora (Bissett, 2009).



### **1.2.3.6. ČIMBENICI RASTA**

Čimbenici rasta reguliraju unutarstaničnu i međustaničnu signalizaciju koje su ključne u cijeljenju rane. Stotine različitih čimenika rasta pomaže u liječenju rana posredujući u angiogenezi, reguliranju proteina matriksa kao što su kolagen i proteoglikani, te u poticanju mitoze fibroblasta, endotelnih stanica, keratinocita i hematopoetskih stanica. Pretpostavlja se da konačne ishode u cijeljenju određuje interakcija velikog broja čimbenika rasta. Čimbenici rasta predstavljaju grupu kozmeceutskih tvari potencijalno djelotvornih u smanjivanju znakova fotostarenja kože jer obnova tako oštećene kože zahtijeva remodeliranje tkiva slično kao i kod cijeljenja kroničnih rana. U pilot istraživanju na 14 dobrovoljaca sa fotooštećenom kožom primijenjivana je dva puta dnevno kroz 60 dana kombinacija raznih čimbenika rasta dobivena iz kulture ljudskih fibroblasta. Na kraju istraživanja kod 11 od 14 dobrovoljaca (79%) uočeno je kliničko poboljšanje bora. Rezultati biopsije pokazali su povećanje formiranja novog kolagena za 37% i povećanje epidermalne gustoće kože za 27%. Potrebno je provesti dodatna ispitivanja kako bi se objasnile sve uloge čimbenika rasta u poništavanju fotooštećenja kože te kako bi se razjasnilo koji čimbenici rasta su najdjelotvorniji (Dahiya i Romano, 2006).

### **1.3. KOZMECEUTICI – SADAŠNJI TREND I ANALIZA TRŽIŠTA**

Pojam „kozmeceutici“, prvi je uveo dr. Albert Kligman opisujući ih kao hibridnu kategoriju proizvoda koji se svojim djelovanjem nalaze između lijekova i kozmetike, pokazujući terapijsku učinkovitost, ali ne nužno i biološku učinkovitost. Kozmeceutici su postali najbrže rastući segment industrije za osobnu njegu. Potrošači i dermatolozi često su preplavljeni velikim brojem dostupnih kozmetičkih proizvoda. Mnoštvo proizvoda nije strogo regulirano pa su potrošači često izloženi informacija koje nisu znanstveno utemeljene ili potpomognute strogim kliničkim ispitivanjima. Tako proizvodi biljnog podrijetla potencijalno mogu dovesti potrošače u zabludu u pogledu sigurnosti primjene tih proizvoda. Također neki kozmeceutici ne pokazuju učinke koje su proizvođači naveli za taj proizvod. Stoga dermatolozi moraju biti svjesni takvih problema kada savjetuju pacijente kako bi ih zaštitili od skupih, neučinkovitih ili potencijalno štetnih proizvoda. Iako američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*; FDA) ne priznaje ovaj pojam, kozmetička industrija ga koristi i opisuje da se odnosi na kozmetičke proizvode koji imaju djelotvornost. Usporedbe radi, farmaceutici su tvari namijenjene za promjenu ili zaštitu kože od abnormalnih ili patoloških stanja. Popularni kozmeceutici koji se često koriste uključuju tvari za ovlaživanje kože,

retinoide, antioksidanse i tvari za izbjeljivanje kože. Poput kozmetičkih proizvoda, kozmeceutici se također primjenjuju topikalno, ali se razlikuju u tome što sadrže potentne tvari koje mogu utjecati na biološku funkciju kože i dostavu nutrijenata u svrhu promicanja zdravlja kože. Kozmeceutici, posebno čistači i ovlaživači, koriste se postoperativno, nakon kozmetičkih operacija, kako bi osigurali optimalne rezultate operacije i zadovoljstvo pacijenta. Najnoviji trendovi u razvoju kozmeceutika uključuju one koji se bave zaštitom kože od zračenja i oksidativnog stresa s fokusom na neiritirajućim tvarima. Proizvodi retinoida namijenjeni za topikalnu primjenu najvažnija su klasa lijekova u borbi protiv starenja kože sa dokazanim kliničkim učincima u brojnim istraživanjima s histološkim procjenama. Retinoidi djeluju preko retinola i retinoične kiseline vazanjem na regulatore rasta i diferencijacije, inhibiraju promociju tumora, smanjuju upalu i poboljšavaju imunološki sustav. U prirodi se vitamin A pojavljuje kao najčešće korišten retinoid s učinkom na stabilizaciju slobodnih kisikovih radikala koji nastaju nakon izlaganja kože UV zračenju. Trans-retinoidna kiselina ili tretinoin, je prvi retinoid koji je korišten za poboljšanje kože i koji je imao učinke i na epidermis i na dermis. Uočeno je da tretinoin smanjuje hrapavost kože te kemijski djeluje na oštećenja kože. Iskustva pacijenata su pokazala da tretinoin iritira kožu te da koža ima bolju toleranciju prema retinolu. Osim retinoida, na tržištu su popularni i antioksidansi među kojima su najznačajniji  $\alpha$ -lipoična kiselina, ibedenon kinetin i niacinamid. Antioksidansi su se pojavili kao najveća grupa proizvoda u kategoriji aktivnih kozmeceutika, primjereni topikalnoj primjeni. Kao i kod retinoida, njihova je funkcija sprječiti oštećenja staničnih proteina i genskog materijala uzrokovana slobodnim radikalima. Funkcije antioksidansa su dokazane brojnim pozitivnim učincima protiv starenja kože. U aktivne komponente kozmetičkih proizvoda pripadaju i biljne tvari, enzimi, hijaluronska kiselina, aminokiseline i peptidi. Razvoj drugih industrija poput nanotehnološke također govori u prilog sve većem razvoju kozmeceutika. S obzirom da kozmeceutici nisu regulirani od strane FDA, točnost oglašavanja kozmeceutičkih proizvoda ispitivana je od strane Savezne trgovinske komisije (engl. *Federal Trade Commission*; FTC). Radi znanstvene ispravnosti proizvoda, zadaća FTC je ispitati tvrdnje oglašivača o farmaceutskim svojstvima i učincima. Svaka tvrdnja koju proizvođač navodi o proizvodu, a ima učinak na strukturu ili funkciju ljudskog tijela mora biti potvrđena znanstvenim dokazima kako bi izbjegli istragu od strane FTC. Na tržištu postoji približno 400 proizvođača kozmeceutika, uključujući tvrtke koje opskrbljuju kozmeceutskim proizvodima tržište SAD-a. Najveće kompanije gotovih proizvoda koje zajedno čine gotovo polovicu ukupnog tržišta u SAD-u su Procter & Gamble, Johnson & Johnson, L'Oréal, Estée Lauder, Avon and Allergan. Najznačajniji brendovi su StriVectin, N.V.Perricone, Murad, DDF, Hylexin, MD Skincare, Dr.

Brandt, Erno Laszlo, Peter Thomas Roth i Rodan + Fields. Kozmeceutici za njegu kože zauzimaju gotovo 80% ukupnog tržišta Europe i SAD-a. Stalno natjecanje između velikog broja proizvođača na tržištu ima negativne utjecaje na strože propise i oprez potrošača u pogledu potrošnje proizvoda. Stroži propisi bi trebali pokušati dodatno objasniti razliku između farmaceutika i kozmetike. Natjecanje između različitih proizvođača je u stalnom porastu iz više razloga. Alternativni tretmani postaju sve popularniji. Na primjer, laserski tretmani nude značajnije i brže rezultate od kozmeceutskih proizvoda. Međutim, i cijena tih tretmana je skuplja i oni sa sobom nose veći rizik. Natjecanje je prisutno i zbog sve većeg broja privatnih brendova na tržištu te sve bržeg pojavljivanja inovativnih sastojaka i proizvoda (Brandt i sur., 2011).

### **1.3.1. OSNOVNE PODLOGE ZA OBLIKOVANJE KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA**

Djelotvornost, podnošljivost i osobine kozmetičkih proizvoda određene su ne samo kroz individualne aktivne tvari, već i podlogom koja se koristi. Dokazano je da dobro oblikovana podloga, prilagođena odgovarajućoj koži može imati brojne pozitivne učinke (npr. hidratacija i stabilizacija epidermalne barijere). Nadalje, diferencirani galenski pripravci imaju veliki značaj, budući da djelovanje mnogih kozmetičkih tvari ovisi o cjelokupnom obliku. Dok, na primjer, petrolatum dozvoljava samo umjerenu penetraciju vitamina E u kožu, mikro- ili nano-emulzija može značajno povećati njegovu penetraciju. Cjelokupan oblik zajedno s interakcijom između podloge, aktivne tvari i kože, utječe na djelotvornost proizvoda kao i na oslobađanje aktivne tvari. Važne osnovne i pomoćne sirovine u kozmetičkim proizvodima prikazani su u Tablici 1 (Kerscher i Buntrock, 2011).

**Tablica 1.** Primjeri najznačajnijih sirovina koje se koriste u izradi kozmetičkih proizvoda (Kerscher i Buntrock, 2011).

Sirovina	Funkcionalne značajke	Primjer
Emolijensi / Emulgirajuće podloge	Glavne sirovine za izradu polučvrstih podloga	Karnauba vosak, Cetilni alkohol, Cetilni esteri, Lanolin, Mikrokristalični vosak, Parafin, Polietilenglikol, Stearinska kiselina, Stearilni alkohol, Bijeli vosak, Žuti vosak
Emulgatori	Stabiliziraju emulzije, poboljšavaju topljivost hidrofbnih aktivnih tvari	Polisorbat 20, Polisorbat 80, Polisorbat 60, Poloksameri, Emulgirajući vosak, Sorbitan monostearat, Sorbitan monooleat, Natrijev lauril sulfat, Propilenglikol monostearat
Humekstansi	Održavaju vlažnost i sprječavaju gubitak vlage	Glicerol, Propilenglikol, Polietilenglikol, Sorbitol, 1,2,6 Heksantriol
Sirovine za povećanje viskoznosti/ geliranje	Povećavaju viskoznost Glavne sirovine za izradu gelova	Karbomer, Metilceluloza, Natrijeva karboksimetilceluloza, Karagenan, Guar guma, Hidroksipropilceluloza, Hidroksipropilmetilceluloza, Želatina, Polietilenoksid, Alginska kiselina, Natrijev alginat
Konzervansi	Sprječavaju mikrobiološku kontaminaciju	Benzojeva kiselina, Propilparaben, Metilparaben, Imidurea, Sorbinska kiselina, Kalijev sorbat, Benzalkonijev klorid
Pojačivači prijenosa aktivnih tvari	Povećavaju obim prijenosa aktivnih tvari kroz rožnati sloj	Propilenglikol, Etanol, Izopropilni alkohol, Polietilenglikol, Oleinska kiselina
Sredstva za keliranje	Vežu metalne ione, smanjuju metalima kataliziranu razgradnju i poboljšavaju učinak konzervansa	Etilendiamintetraacetat
Antioksidansi	Sprječavaju oksidacijsku razgradnju	Butilhidrokisanisol, Butilhidroksitoluen
Kiseline/Baze/ Puferi	Održavaju pH oblika	Citratna kiselina, Fosforna kiselina, Natrijev hidroksid
Otapala/ Sredstva za dispergiranje	Olakšavaju otapanje i/ili dispergiranje aktivne tvari	Pročišćena voda, Heksilenglikol, Propilenglikol, Mineralna ulja, Oleilni alkohol

### 1.3.2. PROCJENA SIGURNOSTI KOZMETIČKIH PROIZVODA

Kad se kozmetički proizvod stavlja na tržište, odgovorna osoba dužna je čuvati dokumentaciju s podacima o tom proizvodu. Takvu dokumentaciju potrebno je čuvati deset godina od datuma kada je posljednja serija kozmetičkog proizvoda stavljena na tržište. Dokumentacija mora sadržavati sljedeće informacije i podatke, koje prema potrebi treba ažurirati: opis kozmetičkog

proizvoda koji omogućuje da se dokumentacija s podacima o proizvodu jasno poveže s kozmetičkim proizvodom; izvješće o sigurnosti kozmetičkog proizvoda iz članka 10. stavka 1.; opis proizvodne metode i izjavu o sukladnosti s dobrom proizvodnom praksom iz članka 8.; ako je to opravdano zbog prirode ili učinka kozmetičkog proizvoda, dokaz o učinku za koji se tvrdi da ga posjeduje kozmetički proizvod; podatke o bilo kakvim ispitivanjima na životinjama koje su izvršili proizvođač, njegovi zastupnici ili dobavljači u vezi s razvojem ili procjenom sigurnosti kozmetičkog proizvoda ili njegovih sastojaka, uključujući bilo koje ispitivanje na životinjama izvršeno kako bi se ispunili zakonski ili regulatorni zahtjevi trećih zemalja. Odgovorna osoba osigurava dostupnost dokumentacije u elektroničkom ili drugom obliku na adresi naznačenoj na ambalaži proizvoda za potrebe nadležnog tijela države članice u kojoj se ta dokumentacija čuva. Podaci sadržani u dokumentaciji moraju biti napisani na jeziku koji nadležna tijela države članice mogu lako razumijeti (Uredba EZ br. 1223/2009).

Izvješće o sigurnosti kozmetičkog proizvoda sastoji se od dva dijela. U prvom dijelu sadržani su podaci o sigurnosti kozmetičkog proizvoda. Takvi podaci podrazumijevaju: kvantitativni i kvalitativni sastav kozmetičkog proizvoda, uključujući kemijski identitet tvari (uključujući kemijski naziv, INCI, CAS, EINECS/ELINCS, po mogućnosti) i njihova namjena. U slučaju parfema i aromatskih spojeva, opis naziva i broj šifre spoja, te identitet dobavljača.; fizikalno – kemijska svojstva tvari ili smjesa, te kozmetičkog proizvoda. Stabilnost kozmetičkog proizvoda u razumno predvidljivim uvjetima skladištenja; mikrobiološke specifikacije tvari ili smjese i kozmetičkog proizvoda. Posebnu se pozornost posvećuje kozmetičkim proizvodima koji se koriste oko očiju, općenito na sluznici, oštećenoj koži, djeci mlađoj od tri godine, starijima i osobama s oslabljenim imunološkim sustavom. Rezultati ispitivanja učinkovitosti konzerviranja; čistoću tvari i smjesa. U slučaju prisutnosti zabranjenih tvari u tragovima, dokazi o njihovoj tehničkoj neizbježnosti. Odgovarajuća obilježja ambalažnog materijala, posebno čistoću i stabilnost; uobičajene i razumno predvidljive uvjete uporabe proizvoda. Obrazloženje mora biti utemeljeno posebno s obzirom na upozorenja i ostala objašnjenja na oznaci proizvoda; podatke o izloženosti kozmetičkom proizvodu, uzimajući u obzir nalaze u vezi s mjestom, površinom nanošenja, količinom upotrijebljenog proizvoda, trajanjem i učestalošću uporabe, uobičajenim i razumno predvidljivim načinom uporabe, ciljnom (ili izloženom) populacijom. Uzima se u obzir i moguća izloženost određene populacije. Pri izračunu izloženosti također se uzimaju u obzir toksikološki učinci, koje je potrebno proučiti (npr. može biti potrebno izračunati izloženost po jedinici površine kože ili po jedinici tjelesne mase). Potrebno je uzeti u obzir i mogućnost sekundare izloženosti načinima koji ne proizlaze iz izravne uporabe (npr.

nenamjerno udisanje sprejeva, nenamjerno gutanje proizvoda za njegu usana itd.). Posebnu pozornost treba posvetiti svim mogućim učincima na izloženost zbog veličine čestica; podatke o izloženosti tvarima koje sadrži kozmetički proizvod za odgovarajuće toksikološke parametre; toksikološki profil tvari koju sadrži kozmetički proizvod za sve odgovarajuće toksikološke parametre. Posebnu pozornost posvetiti ocjeni lokalne toksičnosti (nadražaji kože i očiju), senzibilizacije kože i, u slučaju apsorpcije UV zračenja, fototoksičnosti. Treba uzeti u obzir sve značajne toksikološke načine apsorpcije, kao i sustavne učinke, te izračunati granicu sigurne uporabe (engl. *Margin of Safety*; MoS) koja se temelji na razini bez zapaženog štetnog učinka (engl. *No Observed Adverse Effects Level*; NOAEL). Posebnu pozornost treba posvetiti svim mogućim učincima na toksikološki profil (veličina čestica, uključujući nanomaterijale, nečistoće upotrijebljenih tvari i sirovina) i međusobno djelovanje tvari. Svaku uporabu dokaza iz različitih izvora treba potkrijepiti i valjano obrazložiti te jasno navesti izvor podataka; sve raspoložive podatke o neželjenim učincima i ozbiljnim neželjenim učincima kozmetičkog proizvoda i, prema potrebi, drugih kozmetičkih proizvoda. To uključuje statističke podatke; ostale primjenjive podatke, npr. postojeća ispitivanja na dobrovoljcima ili propisno potvrđeni i dokazani nalazi ocjena rizika izvršenih u drugim povezanim područjima. Drugi dio odnosi se na ocjenu sigurnosti kozmetičkog proizvoda. Drugi dio sadrži: izjavu o sigurnosti kozmetičkog proizvoda; izjavu o potrebi navođenja bilo kojeg posebnog upozorenja i uputa za uporabu; izlaganje znanstvenog obrazloženja na temelju kojeg su doneseni zaključak ocjene i izjava o potrebi navođenja bilo kojeg posebnog upozorenja. Prema potrebi treba obrazložiti i razmotriti granice sigurne uporabe. Između ostalog je potrebno izraditi posebnu ocjenu kozmetičkih proizvoda koji su namijenjeni za uporabu na djeci mlađoj od tri godine i kozmetičkih proizvoda koji su isključivo namijenjeni vanjskoj intimnoj higijeni. Ocjenjuje se i moguće međusobno djelovanje tvari koje su sadržane u kozmetičkom proizvodu. Uzimanje i neuzimanje različitih toksikoloških profila treba valjano obrazložiti. Također treba razmotriti učinke stabilnosti na sigurnost kozmetičkog proizvoda; ime i adresu ocjenjivača sigurnosti. Dokaz o osposobljenosti ocjenjivača sigurnosti. Datum i potpis ocjenjivača sigurnosti (Uredba EZ br. 1223/2009).

### 1.3.3. UČINKOVITOST I SIGURNOST PRIMJENE KOZMECEUTIKA

#### 1.3.3.1. TVARI ZA IZBJELJIVANJE I/ILI DEPIGMENTACIJU KOŽE

Topikalno primjenjen hidrokinon u koncentraciji od 2% do 4%, sam ili u kombinaciji s tretinoinom koncentracije 0,05% do 0,1% uspješno je korišten u liječenju melazme. Upotreba hidrokinona može iritirati kožu i tako izazvati kontaktni dermatitis, uglavnom u dozama od 4% ili više ili u kombinaciji s tretinoinom, što predstavlja problem kod upotrebe. Također je i nestabilan te lako oksidira u kozmetičkim proizvodima. Stoga je bitno da je proizvod primjereno zatvoren, kako bi se izbjeglo izlaganje svjetlu i zraku. Rijedak štetni učinak hidrokinona je egzogena ohronoza koja je karakterizirana progresivnim tamnjenjem područja kože koje je bilo izloženo njegovu djelovanju. Derivati hidrokinona također pokazuju obećavajuće rezultate u izbjeljivanju kože. Jedan od derivata hidrokinona je arbutin ( $\beta$ -D-glukopiranozid), spoj izoliran iz lista medvjette, brusnice, murve ili grmlja borovnice te iz mnogih vrsta krušaka. Čisti oblici arbutina, kao što su  $\alpha$ -arbutin,  $\beta$ -arbutin i deoksiarbutin, smatraju se učinkovitijim tvarima za izbjeljivanje kože. U *in vitro* istraživanjima, deoksiarbutin je učinkovitije inhibirao tirozinazu gljive od hidrokinona i arbutina. U kliničkim ispitivanjima na svijetlim i tamnim ljudima, topikalna primjena deoksiarbutina kroz 12 tjedana značajno je ili slabo izbijelila i poboljšala stanje kože. Inhibicija sinteze melanina ovisi o primijenjenoj dozi arbutina. Daleko najviše istraživanja, koja opisuju učinke arbutina, je napravljeno u *in vitro* uvjetima. Klinička ispitivanja moraju utvrditi u kojim koncentracijama ili u kojim podlogama je arbutin djelotvorniji u izbjeljivanju kože, te koje su moguće opasnosti primjene. U drugim istraživanjima prikazano je kako drugi fenolni derivati djeluju na B16 stanice melanoma. Istraživanje je pokazalo da bifenilni derivat, 2,2'-dihidroksi-5,5'-dipropil-bifenil (DDB) učinkovitije smanjuje sintezu melanina. DDB inhibira sazrijevanje tirozinaze što dovodi do ubrzane razgradnje tirozina. S obzirom na testiranja, DDB može biti potencijalna tvar za depigmentaciju kože (Gao i sur., 2008).

Na tržištu postoji mnogo različitih oblika i izvora  $\alpha$ -hidroksi kiselina (AHA) koje se koriste za depigmentaciju kože. Najčešće proučavane AHA kiseline su glikolna i mliječna kiselina jer zbog svoje molekularne veličine lako mogu penetrirati u gornje slojeve kože. Općenito se pretpostavlja da AHA kiseline u koncentracijama od 4-15% nisu učinkovite u smanjenju sinteze melanina. Ipak, smatra se da djeluju na ubrzanje *turnover* i ekfolijaciju rožnatog sloja. Druga istraživanja su pak pokazala da pored svog pilirajućeg učinka na kožu, mliječna i glikolna kiselina mogu i inhibirati sintezu melanina. Uočeno je da kod pacijenata s melazmom glikolna kiselina sama ili u kombinaciji s hidrokinonom učinkovito smanjuje pigmentaciju. Međutim,

sve je više dokaza o štetnim učincima proizvoda koji sadrže takve tvari. Nuspojave koje izazivaju AHA kiseline su: crvenilo, stvaranje mjehura, otekline i peckanje kože, svrbež, promjena boje i veća fotoosjetljivost kože. Na pojavnost nuspojava utječu pH i koncentracija kiseline, vrsta podloge te učestalost primjene proizvoda (Gao i sur., 2008).

Pouzdana dokazi *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazali su da je kojična kiselina učinkovita u smanjenju sinteze melanina. Kod pacijenata s melazmom dokazano je da je ona vrlo učinkovita u smanjenju pigmenta. Problem s kojičnom kiselinom je u tome što je ona izrazito nestabilna u kozmetičkim proizvodima. Nakon izlaganja zraku ili sunčevu svjetlu razgrađuje se do smeđe obojenog produkta i gubi svoju učinkovitost. Osim toga, neka kontroverzna istraživanja na nekim sojevima bakterija pokazala su da kojična kiselina ima i mutagena svojstva. Zbog navedenih negativnih svojstava kojične kiseline, sintetiziran je njen stabilni derivat, 5 - [(3 - aminopropil) fosfinoksi] - 2 - (hidroksimetil) - 4H - piran-4-on (kojil-APPA). Primjena takvog derivata na ljudske melanocyte pokazala je da on značajno inhibira aktivnost tirozinaze u roku od 24 sata. Dodatno, smanjuje količinu melanina do 75% na kontrolnim stanicama melanoma i smanjuje sintezu novog melanina do 43%. Permeacija kroz kožu povećana je 8 puta u odnosu na kojičnu kiselinu. Međutim, ne postoji dovoljno dokaza o kliničkoj djelotvornosti i sigurnosti primjene ovog derivata (Gao i sur., 2008).

Primjena krema ili gelova koji sadrže azelatnu kiselinu u koncentraciji od 15% do 20% učinkovita je u liječenju brojnih kožnih bolesti (npr. akne, rozacea). Kliničko ispitivanje na 329 žena s melazmom koje su primijenjivale širok spektar proizvoda za zaštitu od sunca s 20%-tnom azelatnom kiselinom pokazalo je u 63% dobre ili odlične rezultate. Učinak kreme sa azelatnom kiselinom na smanjenje veličine lezija i intenzitet pigmenta kroz 24 tjedna usporediv je s učinkom kreme s 4%-tnim hidrokinonom, samo što kod azelatne kiseline nije uočena alergijska senzitivizacija kože. Međutim, dodatna istraživanja su pokazala da ona više iritira kožu od hidrokinona s glikolnom kiselinom (Gao i sur., 2008).

Topikalni retinoidi kao što su *all-trans*-retinoična kiselina (RA), *13-cis*-retinoična kiselina (izotretinoin), retinol, retinalaldehid, tazaroten i adapalen učinkoviti su u poboljšanju depigmentacije kože. Dokazano je da *all-trans*-retinoična kiselina učinkovito djeluje na melazmu i poslije upalnu hipermelanozu. U kombinacijama s hidrokinonom, 4-hidroksianisolom ili azelatnom kiselinom povećava učinkovitost depigmentirajućih tvari. Nekoliko je osnovnih mehanizama kojima retinoidi djeluju na depigmentaciju kože. *All-trans*-retinoična kiselina inhibira sintezu melanina smanjenjem ekspresije tirozinaze i tirozinaza-



ovisnog proteina 1 u melanocitima. U visokim dozama također može djelovati kao selektivni melanocit toksin. Dodatno povećava *turnover* keratinocita te povećava gubitak melanina iz epidermisa. Sinergističkim djelovanjem RA i hidrokinona inhibira se glutathion-S-transferaza. Topikalno primijenjeni retionidi mogu iritirati kožu uzrokujući crvenilo, suhoću, deskvamaciju, oteknuće kože te subjektivni osjećaj svrbeži i peckanja (Gao i sur., 2008).

Ekstrakt šipka (engl. *Pomegranate extract*; PE) s korom sadrži 90% elagične kiseline i pokazuje inhibitornu aktivnost na tirozinazu gljive u *in vitro* uvjetima. Inhibicija ekstrakta je usporediva s inhibicijom arbutina. Oralno uzet ekstrakt inhibira pigmentaciju uzrokovanu ultraljubičastim zračenjem na stražnjoj strani smeđih zamoraca. Hrana zamoraca obogaćena s PE ima sličan učinak na izbjeljivanje kože kao i hrana sa L-askorbinskom kiselinom. Kod UV-ozračenih zamoraca, PE smanjuje broj DOPA-pozitvni melanocita u epidermisu, dok L-askorbinska kiselina ne smanjuje. Takav učinak ekstrakta vjerojatno se događa uslijed inhibicije proliferacije melanocita i sinteze melanina inhibicijom tirozinaze. Međutim, potrebno je provesti još kliničkih ispitivanja kako bi se potvrdila učinkovitost i sigurnost primjene PE (Gao i sur., 2008).

Glabridin, ekstrakt izoliran iz sladića može inhibirati aktivnost tirozinaze u melanocitima bez citotoksičnog djelovanja i također može smanjiti UV-B induciranu pigmentaciju i eriteme ako se primjeni krema s 0,5%-tnom koncentracijom ovog ekstrakta. Iz sladića se može ekstrahirati još potentnih depigmentirajućih tvari, kao što su glabren, izolikviritigenin, glicirizoflavon i gliazperin, a svaki ovaj spoj inhibira aktivnost tirozinaze drugačijom jačinom (Gao i sur., 2008).

Magnezij-L-askorbil-2-fosfat (MAP) je stabilni derivat askorbinske kiseline. Krema s 10% MAP pokazuje značajan izbjeljujući učinak na više od polovice pacijenata sa melazmom i sunčevim mrljama. Također, pokazuje i protektivni učinak na koži izloženoj UV-B zračenju. Cink  $\alpha$ -2-glikoprotein inhibira stvaranje melanina kod B16 stanica melanoma preko posttranskripcijskih učinaka na proteine tirozinaze. S obzirom da je takav spoj produkt epidermalnih keratinocita, takvo istraživanje pokazuje da epidermalno - deriviran cink  $\alpha$ -2-glikoprotein može igrati važnu ulogu u regulaciji produkcije melanina *in vivo*. Stoga valja napomenuti da endogene tvari mogu biti potencijalni kandidati u kozmetici (Gao i sur., 2008).

### **1.3.3.2. TVARI ZA OVLAŽIVANJE KOŽE**

Zdravi rožnati sloj sadrži oko 10% čvrsto vezane vode, a ona ovisi o pristunosti prirodnih tvari za ovlaživanje. Prirodne tvari za ovlaživanje sastavljene su od aminokiselina i njihovih derivata, koji su nastali kao nusproizvod oštećenja filagrina. Prirodne tvari za ovlaživanje pronađene su unutar stanica kože. Smetnja ranije spomenutih tvari u rožnatom sloju može uzrokovati funkcionalne nedostatke i kliničke simptome. Najčešći problem povezan s defektom rožnatog sloja je suha koža. Takvo stanje povezano je sa subjektivnim i objektivnim karakteristikama. Neke od subjektivnih karakteristika su nelagoda, osjećaj peckanja i zatezanja kože te svrbež. Suha koža na dodir je hrapava i neujednačena. Koža je crvena, suha, bez sjaja, pahuljastog izgleda, s vidljivim pukotinama. Bolesti kože poput atopijskog dermatitisa i ihtioze također su povezane sa suhoćom kože. Tvari za ovlaživanje povećanjem hidratacije smanjuju oštećenja rožnatog sloja i čine ga mekšim i elastičnim. Također povećanjem stupnja hidratacije koža je glađa, mekša i zdravijeg izgleda. Takve tvari također djeluju kao pomoćna sredstva u liječenju dermatoloških bolesti povezanih sa suhoćom kože. S obzirom na sigurnost moraju biti nekomedogene, bez iritirajućih sastojaka i kompatibilne s drugim terapijskim režimima. Na suhoj koži kroz 7 dana ispitan je proizvod s 12%-tnom mliječnom kiselinom koja je neutralizirana s 1%-tnim amonijevim hidroksidom i piridoksin hidrokloridom. Kod pacijenata je zabilježeno statistički značajno poboljšanje hidratacije unutar 3 dana, te nakon 7 dana još bolje poboljšanje u odnosu na kontrolnu skupinu. Pantotenska kiselina, sastojak koenzima A, djeluje kao kofaktor u raznim enzimski kataliziranim reakcijama koje su važne u metabolizmu ugljikohidrata, masnih kiselina, proteina, sterola, steroidnih hormona i porfirina. Topikalnom primjenom dekspanetnola (stabilni alkoholni analog pantotenske kiseline) poboljšana je hidratacija rožnatog sloja, smanjen je transepidermalni gubitak vode te je sačuvana mekoća i elastičnost kože. Lipidni emolijent s ceramidom pokazao je zadovoljavajuće rezultate u liječenju atopijskog dermatitisa kod djece. Krema s 2% nikotinamida ispitana je kroz 4 do 8 tjedana na pacijentima s atopijskim dermatitisom, a kao kontrola poslužio je bijeli parafin. Rezultati su pokazali da krema značajno smanjuje transepidermalni gubitak vode, dok bijeli parafin ne pokazuje takav učinak. Također je uočeno da hidrataciju rožnatog sloja povećava i krema i bijeli parafin. Drugo istraživanje pokazalo je da niacinamid poboljšava barijernu učinkovitost rožnatog sloja te zbog toga pokazuje kliničke dobrobiti na koži pacijenata s rozaceom. Kod kserotične kože smanjena je proteoliza dezmosoma što dovodi do akumulacije korneocita na površini kože. Kseroza inducirana sapunima može biti poboljšana topikalnom primjenom egzogenih proteaza, kao što su goveđi pankreasni kimotripsin, papain i bakterijska proteaza iz

vrste *Bacillus licheniformis*. Alkalaza i optimaza, specifične alkalne bakterijske proteaze su najučinkovitije proteaze. Morfološka i imunološka analiza kože tretirane bakterijskim enzimima pokazala je da topikalno primijenjene proteaze induciraju razgradnju dezmosoma i time potiču deskvamaciju (Gao i sur., 2008).

### **1.3.3.3. TVARI PROTIV BORA**

Bore su jedna od glavnih značajki starenja kože, uključujući i fotostarenje i kronološko starenje kože. Točna patogeneza nastanka bora još uvijek nije dobro poznata. Kod ostarijele kože najznačajnije su promjene u dermisu. Ostarijeli dermis ima fragmentirana elastinska vlakna, manje kolagena i disproporcionalan odnos kolagena tipa I i III. Na dnu bora uočeno je smanjenje kolagena tipa IV. Smanjen je i udio glikozaminoglikana, posebno hijaluronske kiseline. Oštećenje kolagena povezano je s djelovanjem enzima poznatih kao matriksne metaloproteinaze (MMPs). Aktiviranje metaloproteinaza rezultira stvaranjem kolagenaza, želatinaza i stromelizina. Razgradnja elastina također može biti povezana s MMP-2. Peoniflorin (PF), djelomično pročišćen iz korijena plemenitog božura (lat. *Paeonia lactiflora*) štiti stanice od DNA oštećenja induciranog UV-B zračenjem što je pokazano na kulturi normalnih ljudskih keratinocita i na keratinocitima ćelavog miša. Također je pokazano na osmotjednom kliničkom ispitivanju da proizvodi s 0,5% PF smanjuju bore na licu. Pronađeno je i da ekstrakt nonija (lat. *Morinda citrifolia*) regulira biosintezu kolagena tipa I i glikozaminoglikana u kulturi normalnih ljudskih fibroblasta. Iz nonija je izoliran aktivni sastojak sa stimulirajućim djelovanjem na kolagen tipa I- 1,4-dihidroksi-2-metoksi-7-metilantirakinon. Uočeno je da antirakinon značajno povećava razgradnju tip I prokolagen C-terminalnog peptida i glikozaminoglikana, te smanjuje ekspresiju kolagenaze MMP-1 ovisno o dozi u ljudskim fibroblastima. Nanoemulzija sa antirakinonom značajno smanjuje dermalni prokolagen tipa I na goljoj koži miša iz čega se može zaključiti da se ekstrakt nonija može smatrati dobrim kandidatom u borbi protiv bora. U istočnoj Aziji endokarp kestena korišten je kao tvar protiv bora i za učvršćivanje kože. 70%-tni etanolni ekstrakt može prevenirati odvajanje stanica fibroblasta, posebno preko povećanja ekspresije fibronektina i vitronektina. Skoparon (6,7-dimetoksikumarin), izoliran iz ekstrakta unutarnje ljuske kestena pokazuje slična svojstva. Dimetilaminoetanol (DMAE) je analog vitamin B kolina i prekursor je acetilkolina. U randomiziranim, kliničkim ispitivanjima, pokazano je da 3%-tni DMAE gel za lice korišten jednom dnevno kroz 16 tjedana je siguran i učinkovit u smanjenju bora na čelu i periorbitalnih bora, poboljšanju oblika i punoće usana i cjelokupnog

izgleda ostarjele kože. Dugotrajna upotreba (godina dana) DMAE gela povezana je sa dobrim sigurnosnim profilom. Dobrobiti DMAE mogu uključivati potencijalne protuupalne učinke i povećanje čvrstoće kože s mogućim poboljšanjem tonusa osnovnih mišića lica. Ubikinon (Q10) je prisutan u gotovo svim živim stanicama, izuzev nekih bakterija i gljiva. Snažan je antioksidans u stanicama. Može smanjiti UV-A induciranu produkciju kolagenaza u fibroblastima i tako zaštititi kolagen od UV-A inducirane razgradnje. Također, može smanjiti gubitak hijaluronske kiseline, povećavajući razinu glikozaminoglikana te usporiti diobu stanica. Q10 može penetrirati u žive slojeve epidermisa. Topikalnom primjenom ubikinona smanjuje se dubina bora (Gao i sur., 2008).

#### **1.3.3.4. ANTIOKSIDANSI**

Nove metode u zaštiti kože od fotooštećenja, raka i fotostarenja kože su veoma potrebne. Kreme za sunčanje su korisne, ali njihova zaštita nije idealna zbog neadekvatne upotrebe, nepotpune spektralne zaštite i moguće toksičnosti. Premda koža prirodno koristi antioksidanse u svojoj zaštiti od fotooštećenja, sistem može biti preopterećen prekomjernom izloženosti različitim izvorima prooksidansa. Fotokemijske reakcije koje se događaju u koži rezultat su izloženosti sunčevu UV svjetlu koje je apsorbirano raznim kromoforima. Takve reakcije rezultiraju promjenama u DNA poput oksidacije nukleinskih kiselina. Oksidativne reakcije mogu promijeniti i proteine i lipide, dovodeći do promjena u funkcioniranju stanica i starenju tkiva. Reaktivni kisikovi spojevi sastavni su dio anabolizma i katabolizma tkiva, uključujući i kožu. Povećanjem reaktivnih spojeva povećava se oksidativni stres, što je promatrano na visokim metaboličkim zahtjevima kao što su prekomjerno izlaganje suncu, pušenju i zagađenju. Slobodni radikali, definirani kao atomi ili molekule s nesparenim elektronom, uzrokuju mnogo štete. Neki od poznatih slobodnih radikala su superoksidni anion, peroksilni i hidroksilni radikal. Takve molekule su kemijski vrlo reaktivne i kratkog vijeka trajanja te reagiraju u blizini mjesta nastanka. Postoje dva mehanizma prirodne obrane kože – enzimski i neenzimski. Kod enzimskog mehanizma uključeni su razni enzimi poput glutathion peroksidaze i reduktaze, katalaze, bakar-cink superoksid dismutaze i ekstracelularne superoksid dismutaze. Neenzimski mehanizam uključuje antioksidanse. Kompleks antioksidansa sa slobodnim radikalima rezultat je normalnog staničnog disanja ili je nastajanje kompleksa posredovano izlaganjem UV zračenju. Nastanak kompleksa dovodi do redukcije slobodnih radikala, smanjenja umrežavanja i oštećenja DNA te do poboljšanja procesa stanične eliminacije. Zbog porasta potražnje za

fiziološkim antioksidansima u koži preporuča se korištenje topikalnih antioksidansa kao dodatne terapije. Postojeći antioksidansi mogu biti podvrgnuti brzom trošenju. Oralni antioksidansi ne mogu doći do kože u dovoljnoj količini koja bi bila učinkovita. Zbog toga se javlja potreba za topikalnim antioksidansima. Da bi topikalno primijenjeni antioksidansi bili učinkoviti treba savladati nekoliko prepreka: nestabilnost (lako mogu biti reducirani ili oksidirani), boja (teško je stvoriti estetski prihvatljiv proizvod), penetracija u kožu i zaštita antioksidansa od svjetlosti. Novije kategorije antioksidansa uključuju različite tvari kao što su flavonoidi, polifenoli pronađeni u biljkama. Polifenoli su svijetle boje i nude zaštitu od UV zračenja. Kao podskupina flavonoida nalaze se izoflavonoidi, na primjer genistein izoliran iz soje i katehini izolirani iz ekstrakta sjemenki grožđa. Ekstrakt sjemenki grožđa potiče ekspresiju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta u keratinocitima što pozitivno utječe na cijeljenje rane. Druge dobrobiti takvog ekstrakta su poboljšanje zaštitnog faktora (SPF) u proizvodima za zaštitu od sunca i uništenje slobodnih radikala. Ekstrakt zelenog čaja je katehinski polifenolni flavonoid koji djeluje kao protuupalni i modulatorni put u proliferaciji stanica. Sadrži epigallocatehin-3-galat koji stimulira proliferaciju epidermalnih keratinocita, povećava epidermanu gustoću, inhibira UV induciranu apoptozu keratinocita i može inhibirati stvaranje kancerogenih stanica. Piknogenol, ekstrakt borove kore, koristi se kao antioksidans, protuupalna i antikancerogena tvar. Bogat je proantocijanidinima koji uključuju polifenolne biflavonoide. Oni mogu stabilizirati kolagen i elastin vezanjem na elastična vlakna i mogu smanjiti obim razgradnje vlakana uzrokovanu elastazama. Također, blokiraju i oslobađanje upalnih faktora. Likopen, aciklički ugljikovodični karotenoid isto je biljnog porijekla i pokazuje protuupalna i antikancerogena svojstva. Blokira apoptozu nakon izloženosti UV-B zračenju i djeluje protektivno protiv UV-B inducirano fotootštećenja inhibicijom epidermalne ornitin dekarboksilaze. Idebenon je još jedan spoj za koji se vjeruje da ima ulogu u fotozaštiti inhibicijom post-UVB nuklearnog timidina te smanjuje oksidaciju staničnih membranskih lipida (Amer i Maged, 2009).

### **1.3.3.5. TVARI ZA ZAŠTITU OD SUNČEVOG ULTRALJUBIČASTOG ZRAČENJA I PROTIV FOTOSTARENJA KOŽE**

Izloženost kože UV zračenju može izazvati akutne upalne promjene, kao što su eritemi, edemi, pigmentacija i preplanulost kože, te kronične promjene, kao što su fotostarenje, imunosupresija i fotokarcinogeneza. Proizvodi za zaštitu od sunca sprječavaju štetne učinke UV zračenja tako da izravno blokiraju svjetlost ili absorbiraju ultraljubičasto zračenje. Tvari koje se uobičajeno koriste u kozmetičkim proizvodima kao UV-B filtri su para-aminobenzojeva kiselina i njeni derivati, cinamati, salicilati, oktokrilen i ensulizol, a kao UV-A filtri koriste se benzofenoli, butil-metoksidibenzoil i meradimat. Ispitano je i mnogo drugih tvari iz različitih izvora, uključujući kalcitriol, kavena kiselina, polifenolni spojevi, izoflavoni i slično. Štetni učinci zajednički svim proizvodima za sunčanje su iritacija ili alergijski dermatitis i komedogenost. Postoje dva različita tipa starenja kože. Prvo je intrinzično starenje koje je prirodni proces starenja. Drugi oblik je ekstrinzično starenje koje je uzrokovano okolišnim čimbenicima kao što su ponavljajući izrazi lica, gravitacija, poza spavanja, pušenje, te iznad svega izloženost sunčevom zračenju. Zajedničke značajke intrinzičnog starenja su fine bore, tanka i prozirna koža, ispijeni obrazi i područje oko očiju, gubitak čvrstoće na rukama i vratu, progib, suha koža koja svrbi, nemogućnost dovoljnog znojenja, prosjeda kosa koja se s vremenom pretvara u bijelu i gubitak kose. Ekstrinzični faktori, posebno izloženost suncu, često udruženi s normalnim procesom starenja uzrokuju preuranjeno starenje kože. Pojam fotostarenja kože posebno je rezerviran za opisivanje ekstrinzičnog starenja uzrokovanog izloženosti suncu. Fotostarenje je najčešće povezano sa staračkim mrljama, teleangiektazijom, hrapavom kožom, finim borama koje nestanu kad se koža zategne, opuštenom kožom, neujednačenim tenom, aktiničnim keratozama i rakom kože. Kod fotostarenja kože, razrjeđuje se trnasti sloj u epidermisu i izravna se epidermokatana veza. Smanjenje broja melanocita i deregulacija njihove gustoće rezultiraju hipo- ili hipermelanozom te neujednačenim tenom. Smanjuje se i broj Langerhansovih stanica i stanice imaju manje dendrita. Takva koža ima i zadebljana, zapletena, razgrađena nefunkcionalna vlakna u dermisu. Smanjena je i interakcija između kolagenih vlakana i fibroblasta. U eksperimentalnom istraživanju, kronična izloženost normalnih ljudskih fibroblasta UV-A zračenju inducira smanjenje životnog vijeka stanica i povećanje staničnog promjera; MMP-1 je bila prekomjerno izražena nakon ponavljajućeg UV-A zračenja. Fotoostarijela koža ima promijenjive manifestacije proizvedene promjenama različitih staničnih i nestaničnih komponenti kože, a koje su uzrokovane različitim mehanizmima. Teško je osmisлити kozmeceutik s multifunkcionalnim svojstvima koja će

zadovoljiti sve potrebe. Neki od ranije spomenutih kozmeceutika, kao što su tvari za depigmentaciju, ovlaživanje i protiv bora, mogu djelovati samo na neke znakove fotostarenja. Sezamol je razvikan antioksidans čiji je pozitivan učinak na fotooštećenje pokazan na koži miša. Nekoliko topikalnih retinoida (tretinoin, izotretinoin, retinalaldehid, tazaroten) imaju klinički i histološki dokazane učinke u tretiranju fotostarenja. Međutim kod njih su i dokumentirani štetni učinci na kožu, kao što je iritacija kože povezana sa suhoćom, perutanjem i eritemima. Alitretinoin (9-cis-retinoična kiselina) je prirodan endogeni retinoid. On ima sposobnost vezanja i aktiviranja svih poznatih intracelularnih receptora retinoične kiseline, koji bi mogli unaprijediti obnavljajuće mehanizme u oštećenoj koži. U kliničkom ispitivanju malih razmjera pokazano je da su topikalno primijenjen gel sa 0,1%-tnim alitretinoinom pacijenti dobro podnijeli i pokazano je poboljšanje benignih kožnih lezija (seboreična keratoza) i prekancerogenih lezija (aktinična keratoza). Međutim za potvrdu takvih učinaka potrebno je provesti veća i kontrolirana istraživanja. Genistein, sojin izoflavon s raznim biološkim učincima, bitno inhibira karcinogenezu kože i smanjuje starenje kože uzrokovano UV zračenjem na miševima i fotooštećenje kod ljudi. Mehanizam djelovanja uključuje zaštitu DNA od oksidativnog i fotodinamičkog oštećenja, smanjenje signalne transdukcije aktivirane UV-B zračenjem i antioksidativno djelovanje. Međutim i ovdje su potrebna daljnja klinička ispitivanja. Novo oblikovani kompleks vitamina C koji sadrži 10% askorbinske kiseline (topljiva u vodi) i 7% tetraheksildecil askorbata (topljiv u lipidima) u nevodenom polisilikonskom gelu testiran je na polovici lica, dok je na drugoj polovici korišten inaktivni polisilikonski gel. Učinci su procijenjeni klinički i histološki. Uočeno je statistički značajno smanjenje fotostarenja na obrazima i perioralnom području na strani lica koja je tretirana kompleksom vitamina C. Kod nijednog pacijenta nije zabilježena iritacija ili upala kože tijekom primjene takvog kompleksa kroz 12 tjedana. Polifenoli zelenog čaja inhibiraju aktivnost kolagenaze i povećavaju biosintezu kolagena u ljudskim fibroblastima. Također mogu inhibirati i aktivnost tirozinaze. Polifenoli zelenog čaja ili zeleni čaj mogu zaštititi DNA od UV induciranog oštećenja u raznim tipovima stanica, uključujući fibroblaste i keratinocyte kože. Zeleni čaj uzet oralno također pokazuje fotoprotektivne učinke koji se manifestiraju malim oštećenjem DNA. Tako uzet zeleni čaj ili njegovi polifenoli imaju blage nepovoljne učinke kao što su višak plinova, nervoza želuca, mučnina, žarenje oko srca, abdominalna bol, vrtoglavica, glavobolja i bol u mišićima. Premda se zeleni čaj smatra pouzdanim kandidatom u borbi protiv starenja, još nema evidentiranih dokaza o njegovoj topikalnoj primjeni na koži. Treba imati na umu i da su polifenoli zelenog čaja veoma nestabilni i lako mogu oksidirati. Oblikovanje polifenola zelenog čaja kao aktivnih topikalnih tvari stoga predstavlja izazov kozmetičkoj

industriji. N-furfuriladenin (kinetin), citokinski čimbenik rasta koji se može dobiti iz različitih izvora, poput biljaka, dijelova životinja pa čak i iz ljudskog urina. U prisutnosti kalcija može promovirati diferencijaciju ljudskih keratinocita. Također može inhibirati i oksidativno i glikooksidativno oštećenje proteina u *in vitro* uvjetima i oksidativno oštećenje DNA posredovano Fentonovom reakcijom. Kozmetički proizvodi razvijeni i stavljeni na tržište prije nekoliko godina sadrže N(6)-F-furfuriladenin. Međutim i ovdje su potrebna daljna klinička ispitivanja kako bi se potvrdila njegova učinkovitost i sigurnost primjene (Gao i sur., 2008).



## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Istraživanje i razvoj kozmeceutika u posljednje je vrijeme vrlo aktualno. Brojne tvari biljnog ili životinjskog podrijetla jednako kao i novosintetizirane tvari ispituju se s ciljem njihove primjene u kozmetičkim proizvodima. Pored ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti primjene kozmeceutika na različitim modelima, posebno je važno ispitati učinkovitost kozmeceutika nakon njihovog uklanjanja u različite dermalne podloge. Naime, učinak i sigurnost primjene aktivne tvari (kozmeceutika) ovisi o složenom međudjelovanju aktivne tvari, podloge i kože. Koža je barijera prijenosu aktivnih tvari, a takav prijenos posebno ovisi o strukturi (primjerice, debljina, gustoća dlačnih folikula, fizičke značajke), biokemijskom sastavu (primjerice, lipidna kompozicija, obim hidratacije), spolu, dobi i različitim bolesnim stanjima kože. Fizikalno-kemijske značajke molekule aktivne tvari također u veliko mjeri određuju njezino međudjelovanje s dermalnom podlogom i pojedinim strukturama kože. Podloga prilagođena tipu i stanju kože ima brojne pozitivne učinke na kožu. Uzimajući u obzir sve prethodno opisane značajke sigurne i učinkovite primjene kozmeceutika, u ovom diplomskom radu bit će pregledno prikazani peptidni kozmeceutici, kao aktivne tvari koje se u posljednje vrijeme intenzivno istražuju s ciljem njihove primjene u kozmetičkim proizvodima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Pretraživanje literature online baza podataka obavljeno je elektroničkim putem pomoću umreženog računala koje ima online pristup bazama podataka. Pretražene su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct).

Literatura je pretražena prema temi istraživanja, predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pri pretraživanju literature traženi su odgovori na specifična pitanja vezana za problematiku ovoga diplomskog rada. Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga diplomskog rada.

Relevantni članci proučavani su analitično i kritično, a vezano uz: definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir eksperimentalnih metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci, koji su prikazani ovim diplomskim radom. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike, koja sastavni su dio ovoga diplomskog rada.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. BIOLOŠKA ULOGA KONSTITUTIVNIH PEPTIDA KOŽE**

Rožnati sloj predstavlja prvu liniju obrane protiv ulaska mikroorganizama i daje značajan doprinos otpornosti prijenosu molekula u i iz tijela. Međutim, takva fizička barijera osjetljiva je na ozljede i može biti ugrožena nekim bolestima čime je olakšan ulazak oportunističkih mikroba u kožu. Kada mikroorganizmi uđu u inače sterilan unutrašnji okoliš aktiviraju kompleksan imunološki obrambeni sustav. Poznato je da ljudska koža stvara neke antimikrobne tvari koje tvore prirodenu kemijsku zaštitu. Endogeni antimikrobni peptidi (AMPs) molekule su koje proizvodi površina epitela domaćina. U koži sisavaca razlikujemo dvije glavne vrste peptida: defenzini i katelidini. Takvi peptidi djeluju kao efektorne molekule i pokazuju aktivnost protiv širokog raspona mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i virusi. Također su uključeni u obnovu i prilagodbu imunološkog odgovora domaćina. Peptidi kože također imaju ulogu u stimuliranju i reguliranju cijeljenja rana te u upalnim promjenama kože. Mijenjanje dostupnosti takvih peptida na njihovim ciljnim mjestima unutar kože može ponuditi nove terapijske pristupe u liječenju kožnih bolesti i dermatologiji, cijeljenju rana i kozmetičkoj primjeni (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1. ANTIMIKROBNI PEPTIDI**

Katelidini i defenzini predstavljaju dvije najveće grupe antimikrobnih peptida (engl. *Antimicrobial peptides*; AMPs) koji posjeduju inherentnu antimikrobnu aktivnost. Poput većine AMPs pozitivno su nabijeni. Pozitivan naboj aminokiselina nalazi se na jednoj strani molekule, dok se na drugoj strani nalaze hidrofobne grupe (Namjoshi i sur., 2008).

##### **4.1.1.1. KATELIDINI**

Ekspresija katelidina i mišjeg katelidin-ovisnog antimikrobnog peptida (CRAMP) u keratinocitima varira s obzirom na infekcije i/ili ozljede. Samo jedan katelidin je identificiran kod ljudi, humani kationski antibakterijski protein (hCAP18;  $M_r$  18kDa), dok je kod sisavaca poznato sveukupno oko 30 katelidina. Ekspresija hCAP zabilježena je u keratinocitima na mjestima upale u koži i u specijaliziranim keratinocitima nokta, neonatalnoj koži i ekrinim žlijezdama. Katelidin peptid (ljudski katelidin; LL-37) proizvode neutrofili, mastociti i

keratinociti kao odgovor na upalne procese. LL-37 djeluje i kao kemoatraktant za neutrofile, monocite, T-stanice i mastocite. Mastociti mogu proizvesti LL-37 i time dovesti do pozitivne povratne sprege. Povišena razina LL-37 pronađena je u psorijatičnoj koži ( $\approx 304 \mu\text{M}$ ) i ozlijeđenoj koži. LL-37 ima važnu ulogu u obnovi oštećenih tkiva i cijeljenju rana potičući vaskularizaciju i reepitelizaciju rana. Također, potiče stvaranje IL-8, IL-18 i IL-20 u keratinocitima preko MAP kinaznog puta. IL-18, induktor interferona (IFN)- $\gamma$ , je proupalni citokin proizveden intracelularno iz biološki inaktivnog prekursora, pro-IL-18. Proizvodi se u keratinocitima i njegova ekspresija je znatno povišena u bolesnoj koži, poput psorijatične kože u kojoj su ljudski  $\beta$ -defenzin (h $\beta$ D) i LL-37 značajno izraženi. Istražena je potencijalna uloga ljudskog katelicidina u domaćinu osjetljivom na infekciju Herpes simplex virusom (HSV). Ekscema herpetikum (ADEH) komplikacija je HSV 1 ili HSV 2 infekcije koja se javlja kod nekih pacijenata s atopijskim dermatitisom (AD). Ispitana je razlika u ekspresiji katelicidina između pacijenata s atopijskim dermatitisom bez komplikacija (AD) i pacijenata s ADEH. Procijenjena je ekspresija katelicidina biopsijom uzorka kože od pacijenata s AD i pacijenata s ADEH. Glikoprotein D, mjeran s RT-PCR, korišten je kao marker replikacije HSV 2. LL-37 pokazao je djelovanje protiv HSV-2 u antivirusnom pokusu ( $p < 0,01$ ) i zabilježeno je da koncentracija LL-37 niža od  $25 \mu\text{M}$  značajno smanjuje razinu genske ekspresije u prethodno inficiranim keratinocitima. Pronađena je niža razina ekspresije katelicidna u koži s ekscema herpetikum nego u koži bez ove komplikacije (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.2. DEFENZINI**

Defenzini su kationski peptidi ( $M_r$  3-5 kDa). Karakterizira ih 6 cisteinskih ostataka koji tvore karakteristične disulfidne mostove. S obzirom na svrstavanje disulfidnih veza podijeljeni su u alfa, beta i theta potporodice. AMPs iz porodice defenzina pokazuju široku aktivnost protiv gram-negativnih bakterija, gljiva, mikobakterija i virusa s ovojnicom te su izolirani iz neutrofilnih granula, makrofaga i nekih specijaliziranih epitelih stanica tankog crijeva (Namjoshi i sur., 2008).

### ***$\alpha$ -defenzini***

Identificirano je šest  $\alpha$ -defenzina, od kojih su četiri poznata kao ljudski neutrofilni peptidi (HNP)-1, 2, 3, 4 i povezani su s neutrofilima. Druga dva poznata su kao ljudski defenzini (HD)-5 i 6. Ekspimirani su u intestinalnim paneth stanicama i epitelnim stanicama ženskog genitourinarnog trakta.  $\alpha$ -defenzini djeluju i na mikrobe i na domaćina. Posjeduju potencijalnu antivirusnu aktivnost i uočeno je da HNPs 1-3 povećavaju ekspresiju tumor nekrosis faktora (TNF)  $\alpha$  i interleukina-1 u ljudskim monocitima aktiviranim *Staphylococcus aureus*. Ekspresija  $\alpha$ -defenzina proučavana je na karcinomu pločastih stanica jezika u usporedbi sa autogenim netumorskim tkivom. Za separaciju, strukturnu identifikaciju i kvantifikaciju HNPs upotrijebljena je tehnika visokotlačne tekućinske kromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom i aminokiselinsko sekvencioniranje. MALDI-MS analizom odijeljenih frakcija tumorskog i netumorskog tkiva detektirani su peptidi koji masom odgovaraju HNP-1, HNP-2 i HNP-3 što je i potvrđeno aminokiselinskim sekvencioniranjem. Provedena je analiza uparenih uzoraka tumorskog i netumorskog tkiva i uočeno je da je koncentracija defenzina u tumorskom tkivu veća za oko 2-12 puta nego u netumorskom tkivu (Namjoshi i sur., 2008).

### ***$\beta$ -defenzini***

$\beta$ -defenzini identificirani su u mnogim tipovima stanica uključujući epitelne stanice i neutrofile. Kod ljudi su identificirani H $\beta$ D 1-4. H $\beta$ D-1 ( $M_r$  3,9 kDa) je konstitutivni peptid različitih epitelnih tkiva uključujući urogenitalni i respiratorni trakt. H $\beta$ D-2 ( $M_r$  4,3 kDa) izoliran je iz ekstrakta lezija psorijatične kože. Ekspresija H $\beta$ D-1 je konstitutivna, dok se ekspresija H $\beta$ D-2 povećava uslijed ozljeda i upala kože. H $\beta$ D-3 ( $M_r$  5,1 kDa) nedavno je identificiran u epitelnim i neepitelnim tkivima. Pokazuje značajnu baktericidnu aktivnost protiv gram-pozitivnog *Staphylococcus aureus* pri fiziološkim koncentracijama soli. Ekspresija H $\beta$ D-2 i H $\beta$ D-3 inducirana je vanjskim podražajima, uključujući IFN-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i gram pozitivne i negativne bakterije. Brojna istraživanja pokazala su da defenzini primijenjeni u koncentraciji iznad 2  $\mu$ M, imaju kapacitet uništavanja širokog spektra mikroorganizama u uvjetima bez seruma i u prisutnosti malo soli. Također je pokazano da sudjeluju u stimuliranju stečenog imuniteta domaćina. Provedena su i istraživanja da se identificira i lokalizira ekspresija H $\beta$ D-1. RT-PCR i hibridizacija *in situ* pokazali su da su H $\beta$ D-1 mRNA i peptid izraženi u uzorcima kože s različitih mjesta na tijelu (Namjoshi i sur., 2008).

### ***θ-defenzini***

θ-defenzini su nova klasa defenzina izolirana iz neutrofila Rhesus majmuna, a nazvani su tako zbog svoje kružne molekulske strukture. Takva klasa defenzina nije pronađena kod ljudi, stoga ovdje neće biti predmetom rasprave (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.3. GRANULIZIN**

Granulizin je proizvod aktiviranih T stanica i prirodnih stanica ubojica. Razlikuju se od AMPs, kao što su katelicidini i defenzini, jer ih ne proizvodi epitel, nego ih do kože dovode T stanice. Ekspresija granulizina istražena je na različitim upalnim bolestima kože. Provedno je imunoperoksidazno istraživanje biopsijom kože pacijenata s psorijazom, lichen planus, numularnim ekcemom i AD i uspoređeni su rezultati s kožom zdravih pojedinaca. Jaka ekspresija granulozina promatrana je u limfomononuklearnim infiltratima i dermalnim dendritičnim stanicama u psorijaznim plakovima. Vrlo malo granulizin pozitivnih T stanica uočeno je kod AD i numularnog ekcema. Važno je napomenuti da je zabilježeno povećanje broja granulozin pozitivnih T stanica ( $p < 0,01$ ) u psorijazi, gdje su sekundarne bakterijske infekcije izuzetno rijetke. Takva zapažanja daju naslutiti da razina granulizina u lezijama može odrediti relativni rizik od sekundarnih infekcija u nekim upalnim stanjima kože. Povećanje razine granulizina može dati neke dokaze o rezistenciji psorijatičnog plaka na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.4. PSORIAZIN**

Psoriazin ( $M_r$  11 kDa) je još jedan peptid otkriven u lezijama psorijatične kože. Konstitutivno je prisutan u keratinocitima zdrave kože i član je obitelji gena S100. Njegova fiziološka uloga još uvijek nije dobro istražena. Prekomjerna ekspresija psorijazina može biti povezana s upalama koje su zajedničke psorijazi. Kliničkim ispitivanjima otkriveno je da je psorijazin glavni ubilački AMP *Escherichia coli* na zdravoj ljudskoj koži. Psorijazin je bio induciran *in vitro* i *in vivo* keratinocitima *Escherichia coli* ukazujući da njegova žarišna ekspresija proizlazi iz lokalne mikrobne indukcije.  $Zn^{2+}$ - zasićen psorijazin pokazuje smanjenje antimikrobne aktivnosti, upućujući na to da sekvestracija cinka može biti antimikrobni mehanizam djelovanja (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.5. RNAZA 7**

RNaza 7 ( $M_r$  14,5 kDa) je osnovni protein obilno prisutan u zdravoj koži i vjeruje se da je on jedan od glavnih kationskih proteina u zdravoj ljudskoj koži. Može biti inducibilan peptid sve dok su njegove razine u psorijatičnoj koži velike i dok je prisutno povećanje genske ekspresije uzrokovano kontaktom keratinocita s bakterijama (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.6. ADRENOMEDULIN**

Adrenomedulin (AM) ( $M_r$  6 kDa) je peptid građen od 52 aminokiseline i koji je eksprimiran u keratinocitima epidermisa i folikula kose, stanicama ekrinih i apokrinih žlijezda znojnice i sekretornim kanalima normalnih stanica i u tumorima kože različite histologije. Dokazane su njegove brojne fiziološke uloge. Neke od njih su vazodilatacija, renalna homeostaza, hormonska regulacija, neurotransmisija i modulacija rasta. A također, može biti uključen u cijeljenje rana (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.7. ANTILEUKOPROTEAZE**

Antileukoproteaze (ALP) poznate i kao inhibitori mukozne proteaze ili inhibitori sekretorne leukoproteaze, prisutne su u žulju i detektirane u supernatantu kulture primarnih ljudskih keratinocita i različitim tjelesnim tekućinama (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.1.8. DERMICIDIN 1L**

Dermicidin 1L (DCD-1L) je nova obitelj AMP sa širokim spektrom djelovanja i bez sličnosti s ostalim poznatim peptidima. Konstitutivno je eksprimiran u ekrinim žlijezdama znojnicama i prenešen do epidermalne površine. Njegova prisutnost nije pronađena u epidermalnim keratinocitima zdrave ljudske kože (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.2. PEPTIDI ZNAČAJNI ZA CIJELJENJE RANE**

Cijeljenje rane je lokaliziran proces koji uključuje seriju specifičnih i koordiniranih događaja kao što su upala, rana migracija stanica i mitozu, neovaskularizacija i regeneracija ekstracelularnog matriksa (Namjoshi i sur., 2008).

##### **4.1.2.1. ČIMBENIK RASTA**

Polipeptidni čimbenik rasta ima važnu ulogu u cijeljenju rane i egzogenom primjenom može mijenjati takve procese. Dva glavna peptidna čimbenika rasta koja imaju ulogu u cijeljenju su epidermalni čimbenik rasta (EGF) i transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF- $\alpha$ ). Neki od potencijalnih peptida značajnih za cijeljenje rane su: bazični i kiseli fibroblastni čimbenik rasta ( $\beta$ FGF i  $\alpha$ FGF), čimbenik rasta iz trombocita (PDGF-AA, -AB i -BB) i inzulinu sličan čimbenik rasta (IGF-I). EGF/TGF- $\alpha$  receptori eksprimirani su u mnogim tipovima stanica uključujući keratinocyte, fibroblaste, vaskularne endotelne stanice i epitelne stanice probavnog sustava. Cijeljenje različitih rana kod ljudi i životinja poboljšano je primjenom EGF ili TGF- $\alpha$ . EGF također povećava čvrstoću zarezane kože na animalnom modelu kože štakora i animalnom modelu roznice kunića, mačaka i primata (Namjoshi i sur., 2008).

##### **4.1.2.2. RGD PEPTIDI**

Mnoge stanice u izvanstaničnom matriksu (engl. *Extracellular Matrix*; ECM) vezane su preko integrina koji povezuju intracelularni skelet s ECM. Mnogi integrini prepoznaju tripeptid RGD (arginin-glicin-aspartat) u ciljnim proteinima ECM. Kliničkim ispitivanjem pretpostavljeno je da se tijekom proteolitičkog remodeliranja ECM u matriks otpuštaju mali topljivi peptidi koji sadrže RGD. Prethodno je pronađeno da topljivi RGD-peptidi internaliziraju u stanicu na integrin neovisan način i u stanju su direktno vezati i aktivirati kaspazu-3, koja izaziva apoptozu. Mali topljivi peptidi koji sadrže RGD proizvedeni enzimatskim cijepanjem kolagena izazivaju apoptozu dermalnih fibroblasta preko specifične kaspaze-3 (Namjoshi i sur., 2008).



#### **4.1.2.3. PEPTIDI BAKRA**

Peptidi bakra koriste se u njezi kože na isti način kao i vitamin C, alfa lipoična kiselina i ekstrakt zelenog čaja. Bakar je sastavni dio citokrom-c oksidaze i superoksidaze dismutaze koji imaju ulogu u stvaranju energije i posjeduju antioksidativna svojstva. Također je esencijalan za normalan rast, razvoj i funkcioniranje ljudskog organizma. Bakar je vezan za glicin, histidin i lizin koji se koriste u sintezi peptida bakra. Peptidi bakra imaju pozitivan učinak na rast i regulaciju folikula dlaka te primijenjeni na ranu povećavaju raspoloživost kolagena, čvrstoću i angiogenezu tkiva (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.2.4. INTERLEUKINI**

Interleukini (IL) su skupina citokina identificirana zbog svoje uloge u posredovanju imunoloških funkcija. Keratinociti proizvode IL-1 u dva različita oblika: IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . IL-6 ( $M_r$  26 kDa) luče stanice u više glikoziliranih oblika. Razina IL-6 povišena je kod psorijaze, u kulturi keratinocita i stanicama tumora kože. IL-8, poznat kao neutrofil aktivirajući protein (NAP) posreduje u stimulaciji rasta i upalnim procesima. Proizvodi se u dermalnim fibroblastima i keratinocitima kao odgovor na IL-1 ili TNF- $\alpha$ . Kliničkim ispitivanjem pokazano je da se IL-8 stvara *de novo* u stanicama zacijeljujuće rane povećanjem reepitelizacije *in vitro* i *in vivo* stimuliranjem proliferacije i migracije keratinocita (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.3. HORMON RASTA I SRODNI PEPTIDI**

Hormon rasta (GH) i prolaktin (PRL) proizvod su prednjeg režnja hipofize i koža je jedan od ciljnih organa za bioregulaciju GH i PRL. U kulturi stanica pokazano je da dermalni fibroblasti proizvode PRL i GH mRNA. Kliničkim ispitivanjima pokušalo se otkriti da li epidermis posjeduje ekspresiju gena za GH i PRL. Detektirane razine GH i PRL nisu pronađene u mrtvim keratinocitima i malignim melanocitima, ali je uočena ekspresija IGF-1 u malignim uzorcima. GH mRNA prisutna je u zdravoj ljudskoj koži, ali ne i u kulturi epidermalnih keratinocita (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.4. TRANSFORMIRAJUĆI ČIMBENIK RASTA-BETA**

Transformirajući čimbenik rasta-beta (TGF- $\beta$ ) može djelovati kao multifunkcionalni regulator u rastu i diferencijaciji stanica. U ljudskom tkivu pronađene su tri izoforme TGF- $\beta$  - TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 i TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 2 nalazi se u intercelularnim prostorima i svim slojevima epidermisa, dok se TGF- $\beta$ 3 nalazi u subepidermalnom području dermisa (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.5. PROTUUPALNI PEPTIDI**

Peptid T (ASTTTNYT) je ligand za CD3/T4 receptor i sastavni je dio ovojnice gp120 proteina humanog imunodeficijentnog virusa (HIV). Sintetski peptid T i njegov analog, D-Ala-peptid T amid (DAPTA) inhibira vezanje ovojnice HIV-a na membranu mozga kao i infekciju ljudskih T stanica HIV-om u *in vitro* uvjetima. Zbog toga je testiran kao djelatna tvar za liječenje HIV infekcije i psorijaze. Peptidni hormoni izolirani iz proopimelanokortin gena (POMC) i proizvedeni u epidermalnim stanicama (keratinocitima i melanocitima) poznati su zbog svojih imunomodulirajućih svojstava. Antiflamin-1 i antiflamin-2 sintetički su nonapeptidi i inhibitori su fosfolipaze  $A_2$ . I jedan i drugi pokazuju potencijalno protuupalno djelovanje. Oba peptida mogu inhibirati PMN adheziju koristeći leukocitne stimulanse. Antiflamini mogu biti učinkoviti u prevenciji i smanjenju neutrofilom posredovane ozljede tkiva koja prati kronične bolesti poput reumatoidnog artritisa. Psorijaza je bolest karakterizirana upalom i proširenim venama u papilarnom sloju dermisa. Stoga protuupalne tvari mogu mijenjati upalne procese (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.6. HUMANA NEUTROFILNA ELASTAZA**

Humana neutrofilna elastaza (HNE) ( $M_r$  30 kDa) poznata je i kao polimorfonuklearna ili humana leukocitna elastaza (HLE). Sastavni je dio azurofilnih granula ljudskih neutrofila i posjeduje fiziološku ulogu u obrani domaćina i remodeliranju ECM. Detektirana je u psorijatičnim lezijama. Pri normalnim uvjetima njena proteolitička aktivnost kontrolirana je endogenim inhibitorima, ali uslijed upale dolazi do neravnoteže između HNE i njenih inhibitora što dovodi do abnormalne destrukcije tkiva. Tijekom akutnih upalnih poremećaja, lokalna koncentracija HNE prelazi koncentraciju njenih inhibitora, kao što je npr.  $\alpha_1$ -proteinaza, što dovodi do degradacije ECM. S obzirom da je HNE pronađena kod psorijaze, korištenje njenih inhibitora može biti potencijalan način liječenja psorijaze (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.1.7. ELAFIN**

Elafin, poznat i kao kožna antileukoproteinaza, inhibitor je elastaze koji proizvode keratinociti. Prekomjerna ekspresija elafina u epidermisu pronađena je kod cijeljenja rana i kožnih bolesti kao što su psorijaza i epidermalni tumori (karcinom skvamoznih stanica, aktinična keratoza i keratoakantom). Ispitivanjima je utvrđeno da je ekspresija elafina u višim slojevima epidermisa povećana u kožnim lezijama kod Behcetovog sindroma, Sweet sindroma, gangrenozne pioderme, alergijskog vaskulitisa i akutnih infektivnih bolesti. Takvi rezultati sugeriraju da kožne bolesti s neutrofilnom dermalnom infiltracijom mogu pokazati prekomjernu ekspresiju elafina zbog otpuštanja IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  iz neutrofila. Elafin može djelovati i kao zaštitna tvar protiv oštećenja epidermisa neutrofilnom elastazom (Namjoshi i sur., 2008).

### **4.2. ULOGA PEPTIDA U RAZLIČITIM BOLESTIMA KOŽE**

#### **4.2.1. ATOPIJSKI DERMATITIS**

Atopijski dermatitis (AD) je kronična upalna kožna bolest s abnormalnom ekspresijom antimikrobnih peptida. Karakterizirana je suhom kožom i povećanjem transepidermalnog gubitka vode. Oboljela koža može sadržavati *Staphylococcus aureus*. Zbog disfunkcioniranja kožne barijere, smanjenja lipidnih tvari i alkalnog pH kože te povećanog uklanjanja fibronektina i fibrinogena bakterije mogu prodrijeti do živih slojeva kože. Oko 30% pacijenata s AD ima bakterijsku ili virusnu infekciju kože. Ekspresija LL-37 i H $\beta$ D-2 povećana je u pacijenata s upalnim stanjima kože. Antimikrobni peptidi koje proizvode keratinociti tijekom upale pokazuju dobru antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus*, HSV. Stoga nedovoljna ekspresija AMP u AD može dovesti do bakterijske ili virusne infekcije udružene sa bolešću. Keratinociti u lezijama AD izloženi su modulaciji citokina i limfokina. Pacijenti imaju i smanjenu ekspresiju DCD u znoju. Smanjenje ekspresije DCD u korelaciji je s infekcijom i može pridonijeti sklonosti kože za povratnom bakterijskom i virusnom infekcijom i promijenjenoj kolonizaciji kože. Koža pacijenata pokazuje povećanje broja pomagačkih stanica tipa 2 (Th2) ekspresijom IL-4 i IL-13, ali ne i IFN $\alpha$  mRNA. Razvoj kožnih lezija povezan je s lokalnom tkivnom ekspresijom proupalnih citokina i kemokina. Stoga rano liječenje s probioticima može pojačati Th1 imunosti odgovor kod atopijskog dermatitisa. Drugi pristupi liječenju uključuju modulaciju citokina, blokiranje upalnih stanica koristeći antagoniste kemokinskih receptora i inhibicijom aktivacije T stanica te korištenje sintetskih AMPs. Neuropeptidi koji imaju presudnu ulogu u neurogenoj upali mogu biti uključeni u razvoj upale

kože. Tvar P (SP), neurokinin A (NKA) i peptid ovisan o kalcitonin genu (CGRP) glavni su medijatori u reakcijama. Pronađeno je da akutni lokalni predtretman s kapsaicinom koji otpušta CGRP, oponaša antiedemske učinke egzogenog CGRP u ljudskoj koži i na obrazima, što ukazuje da CGRP iz endogenih izvora može inhibirati upalno istjecanje plazme. Učinci kapsaicina i CGRP mogu pružiti nove pristupe u razvoju lijekova za takvu bolest (Namjoshi i sur., 2008).

#### 4.2.2. PSORIJAZA

Psorijaza je bolest kože nepoznate etiologije, karakterizirana epidermalnom hiperplazijom, vaskularnim promjenama i upalom. Oko 2% populacije zapadnih zemalja zahvaćeno je takvom bolešću te se pretpostavlja da geneski čimbenici imaju najznačajniju ulogu u nastanku iste. Protein psoriazin veoma je izražen u epidermisu psorijatičara i najvjerojatnije je u vezi s upalnim stimulansima. Identifikacijom receptora ili ciljnih stanica za ovaj protein olakšao bi se razvoj novih strategija u sprječavanju lokalnog upalnog odgovora koji karakterizira takvu bolest. Kod pacijenata je također povišena i ekspresija elafina u tnastom sloju kože. IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  glavni su upalni citokini koje otpuštaju PMN leukociti u ranoj fazi akutne upale pa se smatra da prekomjerna ekspresija elafina može biti povezana s oslobađanjem IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  iz neutrofila. U psorijatičnoj koži takav peptid ima ulogu u zaštiti epidermisa od oštećenja uzrokovanog neutrofilnom elastazom. ALP u koži psorijatičara prisutan je u dovoljnoj koncentraciji da inhibira neutrofilno stvaranje serinske proteaze HLE. Razvojem inhibitora serinskih proteaza kronična upalna stanja kože mogu biti poboljšana. U mikrobicidnim rekombinantnim ispitivanjima promatrana je antimikrobna aktivnost ALP protiv nekoliko kožnih mikroorganizama kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Candida albicans*. Uočeno je da ALP može aktivno sudjelovati u homeostazi bakterija i kolonizaciji kvasca na ljudsku kožu. IL-1 je od posebnog interesa u psorijazi zbog svog sudjelovanja u stvaranju kemotaktičnih citokina. IL-6 i IL-8 mogu izravno pridonijeti epidermalnoj hiperplaziji. TGF- $\alpha$  koji je potreban za normalan rast epitelnih stanica, u psorijazi je prekomjerno izražen. Ekspresija receptora EGF/TGF- $\alpha$  također je povećana u epidermalnim lezijama. H $\beta$ D-2 i H $\beta$ D-3 također su pronađeni u lezija psorijatične kože. Ekspresiju H $\beta$ D-2 u keratinocitima induciraju IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  ili *P. aeruginosa*. IL-1 i H $\beta$ D-2 imaju ključnu ulogu u obrani epidermisa tijekom upale. Kod psorijaze se često javljaju i sekundarne infekcije, što je objašnjeno prisutnošću brojnih AMP uključujući granulizin za koji

se zna da je prisutan u psorijatičnom plaku. Rnaza 7 prisutna je u zdravoj koži, međutim kod psorijaze su uočene povišene razine takvog peptida. Njegova antimikrobna aktivnost ojačana je zapažanjem da kontakt bakterije i keratinocita inducira gensku ekspresiju Rnaze 7. Bolje razumijevanje uloge takvih peptida može dovesti do novih strategija u liječenju psorijaze i sprječavanja sekundarnih infekcija (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.2.3. CIJELJENJE RANE**

Cijeljenje rane je proces koji uključuje 4 faze: upalu, migraciju, uklanjanje i sazrijevanje. Upala uključuje oslobađanje kemotaktičnih tvari; migracija putovanje keratinocita od ruba rane prema središtu; fibroblasti uklanjaju matriksne komponente dermisa; sazrijevanje uključuje kontrakciju dermisa i skvamoznu diferencijaciju keratinocita na površini rane. Citokini djeluju kao medijatori u sve 4 faze. EGF, TGF i nekoliko drugih čimbenika rasta izolirani iz rane potiču rast i migraciju keratinocita. Na mišjem modelu, EGF-receptorom posredovan signalni put ima važnu ulogu u obnovi rane: povećanje broja EGF receptora prethodi hipertrofičnom odgovoru, dok smanjenje prethodi slabljenju takvog odgovora. Kombinacijom trombocitno vezanog čimbenika rasta (PDGF) s IGF-1 ili TGF- $\alpha$  dolazi do povećanog uklanjanja vezivnog tkiva, angiogeneze, povećanja količine kolagena i sazrijevanja. Potencijalni aktivatori keratinocita, kao što je na primjer IL-1, imaju važnu ulogu u procesu cijeljenja rane. IGF-1 i TGF- $\alpha$  također induciraju ili povećavaju ekspresiju AMPs u ljudskim keratinocitima boreći se time protiv sekundarnih infekcija. Također je pokazano da TGF- $\alpha$  inducira ekspresiju jednakog broja AMPs kao što IL-1 inducira ekspresiju proupalnih citokina. IL-8 je glavni biološki učinkovit PMN atraktant u cijeljenju, a njegove povišene razine također mogu pridonijeti dodatnim aktivnostima u kasnijim fazama cijeljenja rane. Tijekom proteolitičkog remodeliranja ekstracelularnog matriksa, mali topljivi RGD-peptidi mogu se otpustiti u matriksnu sredinu. Kako je poznato da takvi peptidi izravno aktiviraju apoptozu vrlo je vjerojatno da će biti korisni u situacijama u kojima bi nakupljanje leukocita i otpornost na apoptozu pridonijeli patologiji bolesti. Korisni su u cijeljenju rane kad internaliziraju u stanicu i mogu aktivirati apoptozu induciranu kaspazom-3. Peptidi bakra također se koriste u cijeljenju rane. Glicin-L-histidil-L-lizin-Cu (GHK) ubrzava cijeljenje i stimulira biološke procese važne u obnovi tkiva kao što su angiogeneza, živčani izdanci i kemostatičko privlačenje stanica važnih za cijeljenje (makrofagi, monociti, mastociti, kapilarne endotelne stalnice). Također takav peptid djeluje i stimulirajuće na sintezu kolagena. Mogu se koristiti u kombinaciji s Retinom A kako bi smanjili upalu. Mogu

poboljšati cijeljenje smanjenjem upale povećanjem gustoće kožnih nutrijenata nakon kozmetičkih tretmana kao što su kemijski piling, upotreba lasera i dermoabrazija (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.2.4. VIRUSNE BOLESTI**

Promjene u kožnoj barijeri mogu dovesti do infekcije bakterijama i odabranim virusima uključujući HSV, varicella-zoster virus i vaccinia virus. Dokazi o protektivnim učincima AMPs u koži pokazani su indukcijom epidermalnog katelicidina LL-37 tijekom razvoja verucca vulgaris i condyloma accuminatum, dvije infekcije humanog papiloma virusa odgovorne za uobičajene kožne bradavice. Istraženi su učinci katelicidina,  $\alpha$ -denezina,  $\beta$ -defenzina i kontrolnog peptida na replikaciju vaccinia virusa *in vitro*. Katelicidini, ali ne i defenzini pokazuju antibakterijsku aktivnost koja rezultira smanjenjem stvaranja vaccinia plakova (Namjoshi i sur., 2008).

#### **4.2.5 KARCINOM EPITELNIH STANICA KOŽE**

Adrenomedulin, peptid ovisan o kalcitonin genu pronađen je u zdravoj i malignoj koži. Može biti uključen u procese cijeljenja rane, podržava normalni epidermalni *turnover* i djeluje na inicijaciju i proliferaciju tumora. Ima važnu ulogu u homeostazi i karcinogenezi kože. Neki metastatski melanomi pokazuju jaku ekspresiju adrenomedulina na periferiji metastaza, dok melanoma stanice pokazuju malu ili nikakvu ekspresiju. Keratoakantoma pokazuje sličnu raspodjelu adrenomedulina. Stoga je adrenomedulin mogući regulatorni čimbenik rasta kože i malignog tkiva pa ciljanom isporukom do malignog tkiva može izazvati inhibiciju rasta (Namjoshi i sur., 2008).

### **4.3. PEPTIDI KAO KOZMECEUTICI**

#### **4.3.1. PEPTIDI KOJI MODULIRAJU SIGNALNE PUTEVE**

Peptidi koji mogu povećati stvaranje kolagena u fibroblastima ili smanjiti razgradnju postojećeg kolagena oštećenjem kolagenaze potencijalno bi mogli poboljšati klinički izgled finih i grubih bora koje nastaju u oba tipa starenja kože (kronološko i fotostarenje). Kao rezultat ispitivanja cijeljenja rana i genskih ispitivanja na rast i poticanje ljudskih fibroblasta otkriveni su određeni

bioaktivni lanci aminokiselina koji mogu potaknuti ljudske fibroblaste na rast u *in vitro* uvjetima i smanjiti dubinu i veličinu bora *in vivo*. Valin-glicin-valin-alanin-prolin-glicin peptid otkriven je ispitivanjem elastin deriviranog peptida, koji značajno stimulira stvaranje fibroblasta, dok istodobno smanjuje regulaciju ekspresije elastina. Takav aminokiselinski slijed uzrokuje kemotaksiju fibroblasta. Kombinacija takvog peptida s palmitinskom kiselinom, koja pomaže penetraciji peptida, prisutna je u mnogim kozmetičkim proizvodima pod nazivom palmitoil oligopeptid. Ispitana je i uloga tirozin-tirozin-arginin-alanin-aspartam-aspartam-alanin peptidnog slijeda. Pronađeno je da takav peptid inhibira prokolagen-C proteinazu, koja cijepa C-propeptid u prokolagenu tipa I što dovodi do smanjenja razgradnje kolagena. Najpopularniji i najviše ispitivani peptid koji modulira signalne puteve je peptid lizin-treonin-treonin-lizin-serin (KTTKS) pronađen u prokolagenu tipa I. Uočeno je da takav pentapeptid potiče povratnu regulaciju u sintezi kolagena što rezultira povećanjem proteina izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen tipa I i II i fibronektin. KTTKS je kombiniran s palmitinskom kiselinom kako bi se povećao njegov prijenos kroz epidermis i djelovanje u dermisu. Takva kombinacija poznata je pod nazivom palmitoil pentapeptid-3 ili Matriksil. Kliničko ispitivanje u periodu od 12 tjedana na 93 žena bijele rase u dobi između 35-55 godina, pokazalo je da koža dobro podnosi pal-KTTKS i značajne rezultate u smanjenju bora i finih linija u odnosu na kontrolnu skupinu. Tripeptid glicil-L-histidil-L-lizin (GHK) poznat je kao peptid koji modulira prijenosne nosače, ali je uočeno da djeluje i na neke signalne puteve. GHK bez bakra povećava stvaranje kolagena stimuliranjem fibroblasta. Također se kombinira s palmitinskom kiselinom i kao takav je poznat pod nazivom Biopeptid-CL. *In vitro* i *in vivo* istraživanja potvrđuju njegovu stimulaciju u sintezi kolagena i glikozaminoglikana te smanjenje veličine i dubine bora i hrapavosti kože. Lipospondin, tripeptid povezan sa elaidinskom kiselinom (elaidil-KFK ili elaidil-lys-phe-lys) oblikovan je da istovremeno aktivira transformirajući čimbenik rasta (preko peptidne domene) i inhibira mRNA metaloproteinazu matriksa (preko lipofilne domene, elaidinske kiseline). Ispitivanja su pokazala da povećava stvaranje kolagena i tkivnog inhibitora metaloproteinaze 1 (TIMP-1) i smanjuje MMP-1 u fibroblastima. Tripeptid, lizil-valin-lizin, također pokazuje slične učinke na transformirajući čimbenik rasta kada se kombinira s palmitinskom i bistrifluorooctenom kiselinom. Poznat je pod nazivom palmitoil-tripeptid-3/5 ili Syn-Coll. Slične učinke pokazuje i elastin derivirani peptid, Biopeptid-EL (Pal-val-gly-val-val-ala-proil-glicin). Peptamid-6, heksapeptid phe-val-ala-pro-phe-pro (FVAPFP) izoliran iz ekstrakta kvasca ima isti redoslijed kao i proteini toplinskog stresa kvasca. Mehanizam djelovanja je nepoznat, međutim *in vitro* ispitivanja na fibroblastima su pokazala da povećava

ekspresiju gena povezanih sa stresom i funkcijom izvanstaničnog matriksa, a *in vivo* ispitivanja su pokazala povećanje čvrstoće kože (Lupo i Cole, 2007).

#### **4.3.2. PEPTIDI KOJI MODULIRAJU NEUROTRANSMITORE**

Peptidi koji moduliraju neurotransmitore već uklopljeni u kozmetičke proizvode razvijeni su tako da oponašaju djelovanje botulinum neurotoksina. FDA je odobrila samo botulinum neurotoksin tipa A (BTX-A) za subkutanu, intradermalnu i intramuskularnu primjenu na bore lica. Svi serotipovi ovog neurotoksina (A-G) su jednolančani polipeptidi koji inhibiraju otpuštanje acetilkolina u neuromuskularnu sinapsu u tri stupnja. Jednolančani polipeptidi aktiviraju se proteazama razgradnjom na dva lanca- teški i laki lanac. Nakon razgradnje, teški lanac velikim afinitetom veže receptore na presinaptičkoj membrani što omogućuje internalizaciju vezanog toksina u stanicu. Laki lanac je cink ovisna endopeptidaza koja razgrađuje membranu proteina koji su odgovorni za spajanje vezikula acetilkolina na unutarnjoj strani membrane živca. Razgradnjom proteina inhibirano je spajanje vezikula sa živčanom membranom, čime se sprječava otpuštanje acetilkolina u neuromuskularnu sinapsu. Meta BTX-A u stanici je sinoptonemski protein (SNAP-25,  $M_r$  25kDa), koji predstavlja esencijalni protein za uspješno spajanje i otpuštanje vezikula acetilkolina sa presinaptičke membrane. Suprotno tome, botulinum neurotoksin tipa B (BTX-B) razgrađuje protein vezikularne membrane (VAMP), koji je poznat i kao sinaptobrevin. Kao i SNAP-25, nužan je za spajanje i fuziju sinaptičkih vezikula za presinaptičku membranu i otpuštanje acetilkolina. Upotrebom takvih polipeptida inhibiraju se kontrakcije intrinzičnih mišića lica i značajno se smanjuju hiperkinetičke linije lica. Topikalna primjena peptida koji moduliraju neurotransmitore smanjuje kontrakcije mišića lica te smanjuje linije i bore podizanjem praga minimalne mišićne aktivnosti, zahtijevanjem više signala za postizanje pokreta i smanjenjem podsvijesnih pokreta mišića tijekom vremena. Većina takvih peptida djeluje na topljivi kompleks N-etilmaleimid osjetljivi čimbenik vezanja proteinskih receptora (SNARE), ciljajući različite dijelove neuromuskularne sinapse ili postojeće neurotransmitore. Acetil heksapeptid-3 (AC-gly glutamet-gln-arg-arg-NH<sub>2</sub>) sintetički je peptid proizveden po uzoru na N-terminalni kraj proteina SNAP-25 koji inhibira stvaranje SNARE kompleksa i otpuštanje kateholamina. Takav peptid poznat je pod nazivom Argireline. Pronađeno je da acetil heksapeptid-3 inhibira vezanje vezikula sprječavajući stvaranje trostrukog SNARE kompleksa koji sudjeluje u egzocitozi sinaptičkih vezikula. Kliničkim ispitivanjem 5% acetil heksapeptid-3 kreme na uzorku od 10



žena kroz 30 dana uočeno je poboljšanje periorbitalnih bora od 27%. Teoretski, takav peptid može oponašati djelovanje botulinum toksina. Pentapeptid-3, peptid nepoznatog aminokiselinskog slijeda, poznat kao Vialox ima djelovanje slično tubokurarinu. Takav peptid je kompetitivni antagonist acetilkolin postsinaptičkih membranskih receptora. Blokiranjem receptora acetilkolina zatvara se kanal natrijevih iona. S obzirom da nema ulaska natrijevih iona neće doći do depolarizacije stanice i kontrakcije mišića pa glatki mišići ostaju relaksirani. *In vitro* i *in vivo* ispitivanjima potvrđeno je smanjenje kontrakcije mišića, veličine bora i hrapavosti kože. Leuphasyl, još jedan pentapeptid nepoznatog aminokiselinskog slijeda, može mijenjati kalcijeve kanale oponašajući enkefaline. Enkefalini su endogeni opioidi koji inhibiraju aktivnost neurona. Njihovi receptori nalaze se na vanjskoj strani živčane stanice i spojeni su sa inhibitornim G-proteinom. Vezanje enkefalina za takve receptore rezultira otpuštanjem podjedinica G-proteina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) u stanicu. Podjedinice zatvaraju kalcijeve kanale, a otvaraju kalijeve kanale. Sprječavajući ulazak kalcijevih iona u živčanu stanicu onemogućena je fuzija vezikula i otpuštanje acetilkolina u mišiće. Konformacijske promjene uzrokovane vezanjem enkefalin sličnog peptida za receptore enkefalina potiču kaskadne reakcije unutar stanice koje dovode do smanjenja podražljivosti i promjena u otpuštanju acetilkolina, a posljedično i do smanjenja kontrakcije mišića. *In vitro* i *in vivo* kliničkim ispitivanjima takvog peptida potvrđena je njegova učinkovitost u smanjenju otpuštanja neurotransmitora i dubine bora. Ispitivanje je pokazalo i sinergistički učinak zajedno primijenjenih peptida Argireline i Leuphasyl. Tripeptid-3 ( $\beta$ -ala-pro-dab-NH-benzil  $\times$  2 AcOH) nazvan Syn-Ake djeluje slično kao i Walglerin-1. Walglerin-1 je neurotoksin izoliran iz otrova zmije koji se reverzibilnim antagonizmom veže za nikotinske receptore acetilkolina na postsinaptičkoj membrani. Pretpostavljeno je da se veže na epsilon podjedinicu nikotinskih receptora sprečavajući vezanje acetilkolina i otvaranje stanice. Natrijevi ioni ne mogu ući u stanicu i depolarizirati ju pa mišići ostaju relaksirani. Ispitivanjima je potvrđeno smanjenje kontrakcije mišića i dubina bora (Lupo i Cole, 2007).

#### **4.3.3. PEPTIDI KOJI MODULIRAJU PRIJENOSNE NOSAČE**

Peptidi koji moduliraju prijenosne nosače djeluju na dostavu elemenata u tragovima koji su neophodni za cijeljenje rane i u enzimskim procesima. Najčešće korišten takav peptid je peptid koji djeluje na dostavu bakra u stanicu. Bakar je elementarni metal koji pospješuje cijeljenje rane, enzimске procese i angiogenezu. Postoji nekoliko različitih mehanizama kojima djeluje. Lizil oksidaza ovisi o djelovanju bakra, a važan je enzim u stvaranju kolagena i elastina. Bakar

djeluje kao esencijalni kofaktor smanjenjem MMPs i aktivnosti kolagenaze. Tirozinaza i citokrom-c oksidaza također ovise o bakru. Štetni učinci slobodnih radikala objašnjeni su u ispitivanjima fotostarenja kože. Superoksid dismutaza djeluje kao antioksidans i potreban joj je bakar kao kofaktor. Kompleks tripeptida glicil-L-histidil-L-lizin (GHK) i bakra olakšava ulazak bakra u stanicu. Takav peptidni slijed pronađen je u proteinima izvanstaničnog matriksa (primjerice u alfa lancu kolagena) i pretpostavlja se da biva otpušten tijekom cijeljenja rane i upala. Smatra se da u kozmetičkim proizvodima peptid bakra poboljšava čvrstoću i teksturu kože, fine linije i hiperpigmentaciju. GHK-Cu kompleks povećava razinu MMPs/TIMPs i pomaže u pregradnji kožnog tkiva. Također stimulira kolagen I, glikozaminoglikane, citokrom-c oksidazu i tirozinazu. Kao što je ranije spomenuto takav peptid potiče i povratnu spregu obnove kolagena, ali se glavni učinci na fotostarenje kože pripisuju povećanoj dostavi bakra u stanicu. Tripeptid sam i u kombinaciji s bakrom ima pozitivno djelovanje na kolagen. Ispitivanjima je pronađeno da GHK-Cu kompleks povećava razinu MMP-2 i MMP-2 mRNA, kao i TIMP-1 i TIMP-2. Ispitivanjima na modelu rane *in vivo* i kulturi fibroblasta štakora *in vitro* utvrđeno je da GHK-Cu kompleks stimulira kolagen tipa I i glikozaminoglikane dermatan sulfat i hondroitin sulfat. Kultura ljudskih fibroblasta pokaza je povećanje sinteze dermatan sulfata i heparin sulfata nakon primjene GHK-Cu kompleksa. Ograničenim kliničkim ispitivanjima na pacijentima primjenom kozmetičkih proizvoda s GHK-Cu kompleksom kao djelatnom tvari utvrđeno je poboljšanje izgleda finih linija i povećanje gustoće kože (Lupo i Cole, 2007).

#### **4.4. KOZMETOLOŠKO-TEHNOLOŠKI PRISTUPI OBLIKOVANJA I POBOLJŠANJA DERMALNE BIORASPOLOŽIVOSTI PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA**

##### **4.4.1. OBLIKOVANJE KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA S DODATKOM POJAČIVAČA DERMALNE APSORPCIJE**

Najviše ispitivanja povećanja transdermalnog prijenosa lijeka posvećeno je oblikovanju kozmetičkih pripravaka s dodatkom pojačivača dermalne apsorpcije. Pojačivači dermalne apsorpcije lipidnom fluidizacijom povećavaju difuzivnost aktivnih tvari kroz rožnati sloj i tako smanjuju njegovu barijernu učinkovitost. Takav pristup povećava permeaciju velikog broja malih molekula međutim mnogi kemijski pojačivači dermalne apsorpcije imaju ograničenu kliničku primjenu zbog iritacije. U slučaju peptidnih pojačivača potrebne su znatno veće prilagodbe u oblikovanju zbog njihove hidrofilnosti i molekulske mase. Kliničkim ispitivanjem utvrđeno je povećanje transepidermalne penetracije M-TRH, analoga endogenog tripeptida tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH), uklopljenog u terpensku ili etanolnu podlogu. Prijenos M-TRH kroz epidermis iz PBS iznosio je 0,34  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ . U kombinaciji s 50% etanola prijenos se povećao, a u kombinaciji s 47% etanola i 3% cineola prijenos je iznosio 1,60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ . Kod malih peptida uočeno je znatno povećanje apsorpcije, međutim ovaj pristup je ograničavajući za velike peptide i treba primijeniti kemijske pojačivače koji neće denaturirati peptide. Kliničkim ispitivanjem transdermalni prijenos inzulina olakšan je istodobnom primjenom malog sintetskog peptida (ACSSSPSKHCG). Prijenos inzulina dovoljan je da se poveća njegova koncentracija u plazmi i smanji razina glukoze u krvi čak do 11 sati nakon topikalne primjene na animalnom modelu Wister štakora. Takav sintetički peptid također može poboljšati prijenos ljudskog hormona rasta (hGH) što ukazuje da se takva tehnika može koristiti na određenom rasponu proteina. Za djelovanje je ključan slijed peptida jer se svakom promjenom u slijedu smanjuje poboljšanje dermalne apsorpcije. Sličnim ispitivanjem procijenjena je transkutana imunizacija prijenosom rekombinantnog melanoma proteina, hidrofilnog rekombinanta gp100 (HR-gp100). Topikalnom primjenom kompleksa HR-gp100H, koji je nastao vezanjem malog fibrinskog peptida na C'-kraj HR-gp100, značajno je smanjena razina antitijela (3-5 puta) u serumu miša u odnosu na razinu antitijela pronađenu primjenom samog HR-gp100. Aktivacija imunog sistema topikalnim prijenosom pokazana je indukcijom stvaranja antitijela i aktiviranjem Langerhansovih stanica (Benson i Namjoshi, 2008).

#### **4.4.2. UKLAPANJE PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA U NANOTEHNOLOŠKE NOSAČE**

Mikroemulzije su koloidni, optički izotropni, transparentni ili blago opalescentni disperzni sustavi male viskoznosti. Sastoje se od surfaktanta, kosurfaktanta, ulja i vode. Termodinamički su stabilne koloidne disperzije oblikovane bez primjene energije. Ovisno o primijenjenom surfaktantu postoje mikroemulzije različitih mikrostrukture. Mikroemulzija može sadržavati kapljice vode u ulju (tipa V/U) ili kapljice ulja u vodi (tipa U/V) promjera od 20 – 100 nm. U mikroemulzijama amfifilne molekule surfaktanta potpuno oblažu kapljice disperzne faze, pa disperzna i kontinuirana faza nisu u izravnom kontaktu. Mikroemulzije imaju značajne prednosti: jednostavnost primjene, dugotrajna stabilnost, velika sposobnost otapanja hidrofilnih i lipofilnih aktivnih tvari te posljedično njihov olakšan prijenos. Mikroemulzije imaju brojne prednosti u dermalnom i transdermalnom prijenosu aktivnih tvari. Otapaju teško topljive tvari; koristeći lipofilne koloidne faze značajno utječu na penetraciju iznimno lipofilnih aktivnih tvari i pojačavaju njihove učinke. Glavni problem u njihovom oblikovanju predstavlja potreba za velikom količinom surfaktanta. Mogućnost upotrebe takvih koloidnih nosača u budućnosti ovisi o izboru surfaktanata koji se dobro podnose i smanjenju njihove količine. Izazov predstavlja i upotreba mikroemulzija za hidrofilne tvari, kao što su peptidi, proteini, RNA i DNA derivati, u njihovom dermalnom i transdermalnom prijenosu (Neubert, 2011). Glavni razlog razvoja nanoemulzija je poboljšanje prijenosa aktivnih tvari u kožu. Nanoemulzije se sastoje od biljnih, sintetskih ili polusintetskih ulja koja su često stabilizirana fosfolipidima kao surfaktantima. Fosfolipidi su endogene tvari kože i često se koriste kao pojačivači dermalne apsorpcije zbog svoje velike biokompatibilnosti. Uklapanjem kosurfaktanata može se poboljšati permeacija/zadržavanje tvari kroz kožu. Tako na primjer, pozitivno nabijeni surfaktanti mogu djelovati na permeaciju/zadržavanje aktivnih tvari zbog smanjenja interakcija s epitelnim stanicama koje imaju negativan naboj na vanjskoj strani membrane. Različiti čimbenici mogu djelovati na permeaciju. Razvijen je faktorijalni dizajn koji primjenom malog broja ispitivanja pruža maksimum informacija koje mogu pomoći u razvoju različitih procesa oblikovanja. Takav dizajn mogao bi pružiti bolje kombinacije u oblikovanju proizvoda i tako djelovati na permeaciju. Kliničkim ispitivanjem pokazana je mogućnost uklapanja genisteina u topikalne nanoemulzije. Primijenjen je 2<sup>3</sup> faktorijalni dizajn za optimizaciju sastava topikalnih nanoemulzija s genisteinom. Prvi cilj bio je procijeniti istodobne učinke različitih ulja (izopropil-miristat ili ricinusovo ulje), surfaktanata (dioleilfosfatidilkolin ili distearoilfosfatidilkolin) i kosurfaktanata (oleinska kiselina ili oleilamin) na fizikalno-kemijska

svojstva nanoemulzija i zadržavanje genisteina na koži svinjskog uha. Drugi cilj bio je ispitati raspodjelu genisteina u slojeve kože zbog optimizacije oblikovanja (Argenta i sur., 2014).

#### **4.4.2.1. VEZIKULARNI NANONOSAČI**

Koloidne lipidne vezikule nazvane liposomi građene su od lipida, uglavnom kolesterola i fosfolipida, ali i drugih amfifilnih tvari. Multivezikularne vezikule (MVV) sadrže nekoliko vezikula okruženih kružnim lipidnim dvoslojem; multilamelarne vezikule (MLV) sastoje se od nekoliko koncentričnih dvosloja; male unilamelarne vezikule (SUV) sadrže samo jedan lipidni dvosloj. Svrha upotrebe liposoma je optimalno lokaliziranje učinka s minimalnom sistemskom apsorpcijom ili transdermalni prijenos aktivnih tvari s izraženim sistemskim učinkom. Djelovanjem na fizikalno-kemijska svojstva liposoma može se dobiti specijalizirani sustav za prijenos i zaštitu aktivne tvari. Klasični liposomi (MLV) već se koriste u dermalnom prijenosu heparina, diklofenak natrija i jodida. Međutim, postoji nekoliko novih oblika vezikula ovisno o aditivima koji se koriste za oblikovanje: transfersomi, fleksosomi, etosomi, niosomi, vezosomi, invasomi i polimerosomi. Nekoliko ispitivanja procjenjuje potencijal liposomalnih nosača u transdermalnom prijenosu aktivnih tvari. Transfersomi i etosomi pokazuju obećavajuće rezultate. Još uvijek se raspravlja penetriraju li liposomi ili transfersomi kroz rožnati sloj neporomijenjeni ili se ugrađuju u lipide rožnatog sloja. Potrebno je provesti dodatna ispitivanja penetracije vezikularnih nanonosača u i kroz rožnati sloj prije nego se razviju novi proizvodi za dermalnu i transdermalnu primjenu (Neubert, 2011). Uklapanjem interferona (IFN- $\alpha$ ) u liposome povećava se njegovo odlaganje u koži, ali nije zabilježeno povećanje penetracije makromolekula kroz kožu. Dodatkom etanola u strukturu fosfatidilkolina etosoma fluidizira se lipidni dvosloj etosoma i rožnatog sloja što uzrokuje lakšu penetraciju etosoma u kožu. Niosomi su vezikule sastavljene od neinonskih surfaktanata i djeluju kao nosači brojnih kozmeceutika i djelatnih tvari. Mehanizam prijenosa uzrokovan je kombinacijom poboljšanja penetracije surfaktantima i povećanja fleksibilnosti vezikularne strukture. Transfersomi se sastoje od fosfolipida (primjerice fosfatidilkolina), ali također sadrže i surfaktant koji djeluje kao "rubni aktivator" prenoseći deformabilnost na vezikulu. Mogu se provući kroz kanale promjera jedne desetine svog promjera što im omogućava da penetriraju u lipidne domene rožnatog sloja i dođu u dublja tkiva. Vezikule se koriste i kao nosači peptida koji imaju ulogu u cijeljenju rana. Kliničkim ispitivanjem utvrđeno je povećanje čvrstoće rane za 200% primjenom epidermalnog

čimbenika rasta uklopljenog u liposome, dok otopina soli djelatne tvari nije pokazala učinak na cijeljenje rane (Benson i Namjoshi, 2008).

#### **4.4.2.2. MIKRO- I NANOČESTICE**

Upotreba mikro- (MPs) i nanočestica (NPs) u dermatofarmaciji može biti korisna u svrhu osiguravanja prijenosa uklopljenih aktivnih tvari do ciljnih struktura kože. Identificirana su dva puta prijenosa aktivne tvari upotrebom MPs i NPs: dermalna primjena MPs i NPs i folikularna primjena NPs. Prednosti primjene MPs i NPs još uvijek su predmetom rasprava. Veličina MPs važna je za dubinu penetracije, stoga se više preferira dermalna primjena NPs. Razvoj topljivih lipida NPs i lipidnih nanonosača u kombinaciji s okluzijom predmetom su istraživanja. Treba provjeriti valjanost rezultata penetracije aktivnih tvari iz takvih sustava u usporedbi sa standardnim i drugim koloidnim sustavima kao što su mikroemulzije i liposomi. Novi i obećavajući rezultati dobiveni su ispitivanjima penetracije NPs u folikulu dlake gdje je uočeno veliko povećanje dubine penetracije. Unutar folikula dlake NPs mogu poslužiti i kao depoi za aktivne tvari. Međutim, nakon primjene NPs potrebna je masaža. S obzirom na strukturu površine rožnatog sloja folikula dlake, pretpostavljeno je da masaža potiskuje NPs dublje u folikul dlake (Neubert, 2011). Najčešće korištene tvari koje se prenose nanočesticama su retinoična kiselina i tokoferil acetat. Retinoidi su uglavnom prisutni u proizvodima koji se koriste za liječenje akni i protiv starenja kože te se primjenjuju topikalno. Također se najviše ispituje njihov prijenos pomoću MPs i NPs. Djelovanje pokazuju preko nuklearnih hormonskih receptora i retinoidnih X receptora. Molekularni odgovori uzrokovani vezanjem za receptore su raznoliki, ali u kontekstu kožnih bolesti, topikalna primjena retinoida značajno smanjuje upalu, komedone i bore. Klinički se koriste za liječenje *acne vulgaris*, dok se u kozmetičke svrhe koriste u sprječavanju fotostarenja kože. Tretinoin (*all-trans* retinoična kiselina) je nestabilan u prisutnosti svjetla i kisika što predstavlja glavni problem u njegovu korištenju. Također, problem predstavlja i njegova mogućnost izazivanja iritacije kože. Nestabilnost i iritacije pokušalo se smanjiti uklapanjem tretinoina u nanočestice gdje je mehanizam djelovanja kontroliran njegovim oslobađanjem. Poboljšanje stabilnosti i kontrolirano oslobađanje najviše je ispitano u prijenosu retinoida uklopljenih u nanočestice. Kliničko ispitivanje uklapanja tretinoina u topljive lipidne nanočestice s lipofilnim aminom (stearilaminom) pokazalo je poboljšanje stabilnosti za 94%. Ispitivanje iritacije kože provedeno je usporedbom topljivih lipidnih nanočestica s placebo gelom koji sadrži stearilamin i kremom tretinoina koja je

oblikovana korištenjem liposoma. Ispitivanje je provedeno na koži miša. Primjena topljivih lipidnih nanočestica pokazala se boljom od primjene kreme, međutim zbog nedostatka placebo kontrole onemogućeno je daljnje tumačenje takvih rezultata. Anorganske mikročestice, primjerice silicij i kalcij-karbonat, također su korištene kao nosači tretinoina. Osim retinoida, i druge djelatne tvari mogu biti uklopljene u mikro- i nanočestice, primjerice protuupalne i antimikrobne tvari. Razvoj materijala ključan je za oblikovanje topikalnih nanočestica i može znatno poboljšati kinetiku prijenosa aktivnih tvari, ali i otkriti nove biološke učinke na funkciju kože. Postoji nekoliko ograničenja u oblikovanju i karakterizaciji takvih materijala. Takva ograničenja uključuju: sposobnost ponovne proizvodnje određenih oblika i veličina nanočestica; proizvodnju optimalne količine nosača; kontroliranje otpuštanja lijeka i prijenos; i proizvodnju stabilnih materijala koji neće otpuštati štetne produkte razgradnje. U zadnjih nekoliko godina povećao se broj ispitivanja na mikro- i nanočesticama, što ih čini zanimljivim i obećavajućim područjem znanosti (Prow i sur., 2011). Unatoč obećavajućim rezultatima korištenja mikro- i nanočestica s uklopljenim kozmeceuticima, u današnje vrijeme nisu dostupna ispitivanja vezana za uklapanje peptidnih kozmeceutika u takve sustave.

#### **4.4.2.3. POVEĆANJE LIPOFILNOSTI PEPTIDNIH KOZMECEUTIKA PRIPRAVOM KONJUGATA S MASNIM KISELINAMA**

Povećanje dermalne bioraspoloživosti peptidnih kozmeceutika moguće je postići njihovim uklapanjem u liposome ili izradom kemijskih derivata peptidnih kozmeceutika. Najčešće je korišten pristup modifikacije molekule peptidnog kozmeceutika s masnim kiselinama čime se povećava lipofilnost novosintetizirane molekule. Takav pristup uspješno je primijenjen na poboljšanje peptidne permeabilnosti kroz intestinalne i rektalne barijere. Nedavno je takav pristup primijenjen na prijenos tvari putem kože. Kliničkim ispitivanjem dermalna apsorpcija IFN- $\alpha$  kod kojeg su lizinski ostaci zamijenjeni s 10, 11 i 12 palmitoilom (p-IFN- $\alpha$ ) uspoređena je s apsorpcijom izvornog IFN- $\alpha$ . Dermalna apsorpcija p-IFN- $\alpha$  5-6 puta je bolja od apsorpcije IFN- $\alpha$ . Takav pristup ispitan je i za transdermalni prijenos tetrapeptida. Ispitana je učinkovitost transdermalnog prijenosa inhibitora HNE konjugiranjem s kratkim nizom masnih kiselina. Konjugacija HNE s racemičnom smjesom kratkog niza masnih kiselina rezultira nastankom dva diastereoizomera. *In vitro* ispitivanjem na epidermisu ocijenjena je penetracija lipopeptidne smjese. Kumulativna penetracija do receptora nakon 8 sati za D-konjugat iznosi  $320,2 \pm 43,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , dok za L-konjugat iznosi  $149,3 \pm 20,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; istodobno za sam peptid iznosi 0. D-konjugat stabilniji je i bolje penetrira u epidermis od L-konjugata. Primjena takvog

pristupa s ciljem dermalnog prijenosa tvari relativno je nova i temelji se na znanstvenim dokazima, ali može biti manje učinkovita od uobičajenog pristupa jer kemijske modifikacije uključuju stvaranje novog spoja (Benson i Namjoshi, 2008).

**Tablica 2.** Pregledni prikaz suvremenih kozmetičkih proizvoda s peptidnim kozmeceuticima (Mentel i sur., 2012).

PEPTIDNI KOZMECEUTIK	KOZMETIČKI PROIZVOD
Acetil-tetrapeptid-15	UltraCalming Serum Concentrate
Oligopeptid-34	C-12 Concentrate; Pure Light SPF30; Pure Night; ChromaWhite TRx Complex
ARG-LYS polipeptid	AGE Smart Complex; Antioxidant HydraMist; Renewal Lip Complex; Dynamic Skin Recovery SPF30; Age Reversal Eye Complex
Palmitoil-pentapeptid	Power Rich; Extra Firming Booster
Palmitoil-oligopeptid	AGE Smart Complex; Super Rich Repair; Renewal Lip Complex; Age Reversal Eye Complex
Palmitoil-tetrapeptid-7	AGE Smart Complex; Super Rich Repair; Age Reversal Eye Complex



## 5. ZAKLJUČCI

- Sigurnost i učinkovitost peptidnih kozmeceutika pretežno se ispituje na različitim staničnim modelima. Takva *in vitro* ispitivanja mogu služiti kao primarna probirna ispitivanja mogućih aktivnih tvari - kozmeceutika, ali su nužna daljnja klinička ispitivanja njihove učinkovitosti i sigurnosti primjene.
- Bolje razumijevanje uloge konstitutivnih peptida kože u zdravlju i bolesti moguće će pridonijeti razvoju novih peptidnih aktivnih tvari i unaprijediti njihovu primjenu u suvremenim kozmetičkim proizvodima.
- U svrhu osiguravanja učinkovitosti peptidnih kozmeceutika potrebno je osigurati njihovu stabilnost pri izradi i čuvanju kozmetičkog proizvoda
- Ciljana mjesta djelovanja peptidnih kozmeceutika su vijabilni slojevi dermisa pa učinkovitost i sigurnost primjene ovisi o stabilnosti peptidnih kozmeceutika pri njihovom prijenosu preko barijere kože.
- Podloga kozmetičkog proizvoda značajno utječe na topljivost i termodinamičku aktivnost peptidnih kozmeceutika, a što u konačnici određuje njihovu raspodjelu iz podloge do vijabilnih slojeva dermisa.
- Brojni su peptidni kozmeceutici razvijeni i uspješno uklopljeni u suvremene kozmetičke proizvode koji su komercijalno dostupni na različitim svjetskim tržištima.

## 6. LITERATURA

Amer M, Maged M. Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clin Dermatol*, 2009, 27, 428-430.

Argenta DF, de Mattos CB, Misturini FD, Koester LS, Bassani VL, Simoes CM, Teixeira HF. Factorial design applied to the optimization of lipid composition of topical antiherpetic nanoemulsions containing isoflavone genistein. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9, 4737-4747.

Benson HA, Namjoshi S. Proteins and peptides: strategies for delivery to and across the skin. *J Pharm Sci*, 2008, 97, 3591-3610.

Bissett DL. Common cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 2009, 27, 435-445.

Brandt FS, Cazzaniga A, Hann M. Cosmeceuticals: current trends and market analysis. *Semin Cutan Med Surg*, 2011, 30, 141-143.

Čajkovac M. *Kozmetologija*. Zagreb, Slap, 2002, str. 31.

Dahiya A, Romano JF. Cosmeceuticals: A review of their use for aging and photoaged skin, *Cosmetic Dermatol*, 2006, 19, 479-484.

Gao XH, Zhang L, Wei HC, Chen HD. Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 2008, 26, 367-374.

Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65, 152-168.

Karadzovska D, Brooks JD, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Predicting skin permeability from complex vehicles. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65, 265-277.

Kerscher M, Buntrock H. Update on cosmeceuticals. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2011, 9, 314-327.

Lupo MP, Cole AL. Cosmeceutical peptides. *Dermatol Ther*, 2007, 20, 343-349.

Mentel M, Schild J, Maczkiewitz U, Koehler T, Farwick M. Innovative peptide technologies for even, young and healthy looking skin. SOFW-J, 2012, 138, 22-33.

Namioshi S, Caccetta R, Benson HAE. Skin peptides: Biological activity and therapeutic opportunities. J Pharm Sci-US, 2008, 97, 2524-2542.

Neubert RHH. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 77, 1-2.

Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, Wurm EMT, Yoong C, Robertson TA, Soyer HP, Roberts MS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. Adv Drug Deliver Rev, 2011, 63, 470-491.

Uredba (EZ) br. 1223/2009 Europskoga parlamenta i Vijeća od 30. studenoga 2009. o kozmetičkim proizvodima.

## 7. SAŽETAK

Peptidni kozmeceutici su relativno nove tvari koje se koriste u liječenju raznih stanja kože. Tri su glavne skupine peptidnih kozmeceutika: peptidi koji moduliraju signalne puteve, peptidi koji moduliraju neurotransmitore i peptidi koji moduliraju prijenosne nosače. Iako njihove prednosti trenutno nisu strogo ispitane, dokazi o njihovoj upotrebi u stalnom su porastu. Postoji značajan broj potencijalno aktivnih peptidnih tvari koje se mogu koristiti u proizvodima za njegu kože, posebno uzimajući u obzir brojne peptidne aktivne tvari koje su kao sirovina dostupne za izradu kozmetičkih proizvoda. Omjer cijene i učinkovitosti kozmetičkog proizvoda ključan je čimbenik njegovog uspješnog oblikovanja. Sukladno tome ograničavajući čimbenik korištenja pojedinog peptida pri oblikovanju kozmetičkog proizvoda je primjeren odnos isplativosti i potrebnog udjela peptida u kozmetičkom proizvodu te reproducibilnog učinaka takvog peptidnog kozmeceutika.

## SUMMARY

Peptide cosmeceuticals are one of the new, popular options to treat different skin conditions. There are three main categories of cosmeceutical peptides: signal peptides, neurotransmitter-affecting peptides and carrier peptides. Although their benefits currently may not be as rigorously tested, the evidence to support their use is growing. The potential for bioactive peptide ingredients in skin care products is enormous, especially when you consider the diverse assortment of molecules available to the cosmetic formulator today. The cost-benefit ratio is key in this area, and the balance of economics, peptide concentration and, reproducible, stable, deliverable bioactivity, will be the key driver for the success of each peptide on an individual basis.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku tehnologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## PEPTIDNI KOZMECEUTICI

Katarina Janječić

### SAŽETAK

Peptidni kozmeceutici su relativno nove tvari koje se koriste u liječenju raznih stanja kože. Tri su glavne skupine peptidnih kozmeceutika: peptidi koji moduliraju signalne puteve, peptidi koji moduliraju neurotransmitore i peptidi koji moduliraju prijenosne nosače. Iako njihove prednosti trenutno nisu strogo ispitane, dokazi o njihovoj upotrebi u stalnom su porastu. Postoji značajan broj potencijalno aktivnih peptidnih tvari koje se mogu koristiti u proizvodima za njegu kože, posebno uzimajući u obzir brojne peptidne aktivne tvari koje su kao sirovina dostupne za izradu kozmetičkih proizvoda. Omjer cijene i učinkovitosti kozmetičkog proizvoda ključan je čimbenik njegovog uspješnog oblikovanja. Sukladno tome ograničavajući čimbenik korištenja pojedinog peptida pri oblikovanju kozmetičkog proizvoda je primjeren odnos isplativosti i potrebnog udjela peptida u kozmetičkom proizvodu te reproducibilnog učinaka takvog peptidnog kozmeceutika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranice, 1 grafički prikaz, 2 tablice i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: koža, prijenos lijeka, peptidi, kozmeceutici, starenje kože, vezikule, nanočestica, stanja kože, dermatološke tvari/terapeutska primjena

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Biljana Nigović**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Technology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

## PEPTIDE COSMECEUTICALS

**Katarina Janječić**

### SUMMARY

Peptide cosmeceuticals are one of the new, popular options to treat different skin conditions. There are three main categories of cosmeceutical peptides: signal peptides, neurotransmitter-affecting peptides and carrier peptides. Although their benefits currently may not be as rigorously tested, the evidence to support their use is growing. The potential for bioactive peptide ingredients in skin care products is enormous, especially when you consider the diverse assortment of molecules available to the cosmetic formulator today. The cost-benefit ratio is key in this area, and the balance of economics, peptide concentration and, reproducible, stable, deliverable bioactivity, will be the key driver for the success of each peptide on an individual basis.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 1 figure, 2 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: skin, drug delivery, peptides, cosmeceuticals, skin aging, vesicles, nanoparticle, skin conditions, dermatologic Agents/therapeutic use

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasmina Lovrić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2016.

